

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES
ESENCIALES FRENTE A *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* Y
Candida albicans.**

**ANA MARIA QUINTERO REY
CAROL JHULIETH RANGEL VILLEGAS**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2016**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES
ESENCIALES FRENTE A *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* Y
Candida albicans.**

**ANA MARIA QUINTERO REY
CAROL JHULIETH RANGEL VILLEGAS**

Trabajo de grado para optar al título de Química Ambiental

**Director(es) del Proyecto
MARTHA CERVANTES DÍAZ
Química M. Sc
RICARDO RESTREPO MANRIQUE
Biólogo Especialista
LAURA VIVIANA HERRERA SANDOVAL
Bact y L.C, M. Sc**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2016**

"Las ciencias aplicadas no existen, sólo las aplicaciones de la ciencia "
(Louis Pasteur)

*Este trabajo está dedicado a nuestros padres y a las personas que
confiaron en nosotras y nos apoyaron constantemente.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra directora Martha Cervantes y a nuestros co-directores Ricardo Restrepo y Laura Herrera por su dedicación en la redacción, entendimiento y apoyo constante en las diferentes etapas del proyecto presente, por su profesionalismo y experiencia que nos ayudó a aumentar nuestro saber en el campo.

Asimismo, agradecemos al Dr. Amner Muñoz de la Universidad del Norte y al docente Humberto García, encargado del Herbario de la Universidad Industrial de Santander por su colaboración en la obtención de datos valiosos para los resultados de este trabajo.

Agradecemos a nuestros padres por el apoyo moral y económico ofrecido, a nuestros compañeros y laboratoristas por la ayuda y a todas aquellas personas que de una u otra manera nos apoyaron en la culminación de este trabajo.

A todos ustedes, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1.OBJETIVO GENERAL.....	14
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. MARCO TEÓRICO	15
4.1.ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL	16
4.2.COMPUESTOS SINTÉTICOS EMPLEADOS EN EL CONTROL DE <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. faecalis</i>	19
5. MARCO DE ANTECEDENTES	22
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	28
6.1.OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	28
6.2.CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	
30	
6.3.COMPUESTOS DE REFERENCIA EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	30
6.4.DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES	31
7. RESULTADOS	35
7.1.OBTENCIÓN ACEITES ESENCIALES	35

7.2.CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

36

7.3.COMPUESTOS DE REFERENCIA EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....37

6.5.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES.40

7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS45

7.4.ACEITES ESENCIALES.....45

7.5.ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....45

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....49

9. CONCLUSIONES50

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....51

ANEXOS 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Compuestos con estructura de isopropeno	17
Figura 2 Estructura de la azitromicina, derivada de eritromicina.....	19
Figura 3 Estructura de ácido 7-aminocefalosporánico (A), ácido 6-aminopenicilánico (B), ampicilina (C).....	20
Figura 4 Estructura del itraconazol (A) y fluconazol (B)	21
Figura 5 Distribución de número de publicaciones por año relacionadas con actividad antimicrobiana durante el período 2000 a 2016.....	22
Figura 6 Distribución de número de publicaciones por año relacionadas con actividad antimicrobiana y aceites esenciales de acuerdo con la ecuación de búsqueda propuesta.	23
Figura 7. Material vegetal empleado para la extracción de aceites esenciales.	28
Figura 8 Equipo de hidrodestilación asistida por microondas (disponible en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Química Ambiental, U. Santo Tomás, Bucaramanga).	29
Figura 9 Arriba.Diseño de siembra en placa de Elisa de 96 pozos. Abajo der. Wellwash™ microplate washer. Abajo Izq. Multiskan™ FC microplate Photometer (disponible en el Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas, U. Santo Tomás, Bucaramanga).	33
Figura 10 Espectro IR de fluconazol (IR Shimadzu, modelo IRA Affinity-1 con transformada de Fourier)	38
Figura 11 Espectro IR de itraconazol (IR Shimadzu, modelo IRA Affinity-1 con transformada de Fourier)	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Rango de concentración de compuestos de referencia y aceites esenciales evaluados.....	32
Tabla 2. Porcentaje de rendimientos en la obtención de aceite esenciales mediante el método de hidrodestilación asistida por microondas.	35
Tabla 3. Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales bajo estudio.	36
Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	41
Tabla 5. CI_{50} y CI_{90} presentada por los aceites esenciales ($\mu\text{g/ml}$).....	42
Tabla 6. CI_{50} y CI_{90} presentada por los compuestos de referencia ($\mu\text{g/ml}$).....	43
Tabla 7. Determinación de la actividad antimicrobiana de cada AE	44

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del rendimiento	29
Ecuación 2. Para el cálculo de promedios	40
Ecuación 3. Ecuación para el cálculo de la desviación estándar	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo A Cromatogramas de aceites esenciales.....	59
--	----

LISTA DE ACRÓNIMOS

AEs: aceites esenciales.

CBM: concentración bactericida mínima.

CFM: concentración fungicida mínima.

CG: cromatografía de gases.

Cl₅₀: concentración inhibitoria 50.

Cl₉₀: concentración inhibitoria 90.

CLSI: en inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

DMSO: dimetil sulfóxido

EARMO: extracción asistida por radiación de microondas.

EI: enfermedades infecciosas.

FID: siglas en inglés (*Flame Ionization Detector*) detector de ionización de llama.

IR: infrarrojo.

MIC: siglas en inglés (*minimum inhibitory concentration*) concentración mínima inhibitoria.

Pf: punto de fusión.

RAM: reacciones adversas a medicamentos.

TLC: cromatografía en capa fina.

GLOSARIO

ACEITES ESENCIALES: son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas, son mezclas complejas de compuestos alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos¹.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA: es la capacidad de combatir microorganismos o de evitar su aparición².

CANDIDIASIS: es una micosis o infección causada por *Candida sp*, un tipo de hongo microscópico o levadura que habita normalmente en la boca, intestino y piel^{3,4}.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI): es la concentración más baja de un compuesto antimicrobial que inhibe total o parcialmente el crecimiento de un microorganismo tras la incubación⁵.

ENDÉMICO: propio y exclusivo de determinadas localidades o regiones⁶.

ENDOCARDIO: membrana serosa que tapiza las cavidades del corazón⁶.

ENDOCARDITIS: inflamación aguda o crónica del endocardio⁶.

ESTOMATITIS: inflamación de la mucosa bucal⁷.

GLOSITIS ROMBOIDAL MEDIA (GRM): alteración benigna que afecta principalmente a varones y consiste en un área rojiza, romboidal, plana como una mácula⁸.

INMUNOSUPRIMIDO: anulación de la respuesta inmunitaria de un organismo⁹.

NOSOCOMIAL: son infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital y que no estaban presentes ni en el período de incubación ni en el momento del ingreso del paciente⁹.

SHOCK TÓXICO: es un síndrome multiorgánico producido por toxinas estafilocócicas^{3,4}.

SIMBIONTES: individuos de diferentes especies, asociados de manera estrecha y persistente para beneficio de al menos uno de ellos¹⁰.

RESUMEN

Se obtuvieron los aceites esenciales de las plantas medicinales y aromáticas de Anís (*Pimpinella anisum*), Salvia (*Salvia officinalis*), Naranja (*Citrus sinensis*), Cidrón (*Aloysia citriodora*), Geranio (*Pelargonium odoratissimum*), Ruda (*Ruta graveolens*), Poleo (*Hyptis suaveolens*), Mandarina (*Citrus reticulata*), Hinojo (*Foeniculum vulgare*) y Limonaria (*Cymbopogon citratus*), empleando el método de hidrodestilación asistida por microondas. En general, los rendimientos de extracción fueron bajos, entre un 0,08 y un 0,85% para las plantas estudiadas.

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos (corrientes totales reconstruídas) de los aceites estudiados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, los principales componentes mayoritarios presentes en las muestras de acuerdo con los porcentajes de áreas relativas son: limoneno 89,4% (*C. sinensis*), *trans* anetol 70,3 – 85,7% (*F. vulgare* y *P. anisum*), ledol 53% (*S. officinalis*), geranial 39,8% (*C. citratus*), 2-nonanona 35,3% y 2-undecadona 34,8% presentes en *R. graveolens*, y citronelol 24,7% (*P. odoratissimum*).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante el método de microdilución en placa con el fin de obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Candida albicans* (ATCC 60193). En el caso del *S. aureus*, el aceite esencial de cidrón presentó la mejor actividad antimicrobiana con una MIC y CBM de 7500 µg/ml, seguido por la limonaria con una MIC de 11671 µg/ml y una CBM de 15006 µg/ml. Para la *C. albicans*, el aceite de limonaria presentó una MIC de 15006 µg/ml y una CFM de 10004 µg/ml, seguido por el aceite esencial de mandarina con una MIC de 15007 µg/ml y CFM 12506 µg/ml. Para el *E. faecalis*, ninguno de los aceites evaluados presentó actividad antimicrobiana.

PALABRAS CLAVE: Aceites esenciales, actividad antimicrobiana, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, Verbenaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Geraniaceae, Poaceae, Apiaceae, microdilución en placa, MIC.

ABSTRACT

The essential oils of medicinal and aromatic plants Anise (*Pimpinella anisum*), salvia (*Salvia officinalis*), orange (*Citrus sinensis*), Cidrón (*Aloysia citrodora*), geranium (*Pelargonium odoratissimum*), Ruda (*Ruta graveolens*), Poleo (*Hyptis suaveolens*), Mandarin (*Citrus reticulata*), Fennel (*Foeniculum vulgare*) and lemon grass (*Cymbopogon citratus*), using the method of microwave-assisted hydrodistillation. In general, the extraction yields were low, between 0.08 and 0.85% for the plants studied.

The chromatographic profiles (total current reconstructed) oils studied by gas chromatography-mass spectrometry and major constituent present in the samples according to the relative area percentages are obtained 89.4% limonene (*C. sinensis*), trans anethole 70.3 to 85.7% (*F. vulgare* and *P. anisum*), ledol 53% (*S. officinalis*), geranialdehyde 39.8% (*C. citratus*), 2-nonanone 35.3% and 2-undecadone 34.8% present in *R. graveolens*, and citronellol 24.7% (*P. odoratissimum*).

The antimicrobial activity of essential oils was evaluated by the method of microdilution plate in order to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and *Candida albicans* (ATCC 60193). In the case of *S. aureus*, the essential oil of Cidrón it presented the best antimicrobial activity with MIC and MBC of 7500 ug / ml, followed by lemongrass with a MIC of 11671 ug / ml and an MBC of 15006 ug / ml. For *C. albicans*, lemongrass oil presented a MIC of 15006 ug / ml and 10004 CFU ug / ml, followed by the essential oil of tangerine with a MIC of 15007 ug / ml and CFU 12506 ug / ml. For *E. faecalis*, any of the oils tested showed antimicrobial activity.

KEYWORDS: Essential oils, antimicrobial activity, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, Verbenaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Geraniaceae, Poaceae, Apiaceae, microdilution plate, MIC.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempo atrás las plantas han sido utilizadas de manera empírica en el tratamiento de diversas dolencias, aún con desconocimiento de su composición o el funcionamiento de sus principios activos. Con el paso del tiempo, surgió interés por las propiedades que presentaban estas y se iniciaron estudios científicos con el fin de determinar la razón de su actuar; como consecuencia de los resultados encontrados, la industria farmacéutica optó por sintetizar algunas de las moléculas encontradas en sus estudios y que presentaban propiedades curativas.

La aparición de cepas resistentes, como *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente, y el uso excesivo de fármacos o su uso inadecuado, ha hecho necesario fortalecer la investigación en el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos de origen natural, dentro de los cuales se cuentan los aceites esenciales, cuya actividad biológica se conoce desde tiempos ancestrales¹¹

Como consecuencias de lo anterior, nuevamente la industria farmacéutica ha buscado soluciones alternativas para el tratamiento de las enfermedades e infecciones que ya no es posible tratar por los métodos convencionales, por esto se ha retomado el estudio de diferentes compuestos de origen natural, como los aceites esenciales de diversas plantas, para encontrar componentes que puedan ser útiles en los tratamientos.

Los aceites esenciales están constituidos por una mezcla numerosa de compuestos aislados de las plantas aromáticas. Actualmente se conocen alrededor de 3000 aceites esenciales de los cuales unos 300 tienen interés comercial, especialmente en las áreas farmacéuticas, alimentos, cosmética y productos de aseo. Estos productos naturales son reconocidos por presentar diversas actividades biológicas, como por ejemplo: antibacterial, antiviral, anti-inflamatoria, antifúngica, anitmutagénica, anticarcinogénica, antioxidante, entre otras^{12,13}.

Consecuentemente, el estudio de las actividades biológicas de los aceites esenciales se ha incrementado debido a la búsqueda de una alternativa farmacéutica segura y natural. En cuanto a la actividad antimicrobial ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, siendo su mayor aplicación como sustituyentes de los compuestos sintéticos empleados como aditivos para alimentos^{12,13}.

La actividad antimicrobiana se entiende como la capacidad que tiene un agente o sustancia, en este caso en específico los aceites esenciales, de inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos como lo son las bacterias y los hongos. En los últimos años, se ha estudiado el efecto de algunos componentes de los aceites esenciales sobre cientos de microorganismos y se han encontrado resultados favorables, aun así, el accionar de los compuestos no es muy claro, puesto que son pocos los estudios direccionados a la actividad de los mismos y su mecanismo de acción¹⁴⁻¹⁷.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad antimicrobiana de diez aceites esenciales pertenecientes a plantas de las familias Verbenaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Geraniaceae, Apiaceae y Poaceae, frente a los microorganismos de *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans*, empleando el método de microdilución en placa, con el fin de obtener el CI₅₀ y el CI₉₀ para cada uno de los aceites evaluados.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las bacterias se dividen en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Dentro de las Gram positivas se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, microorganismos endémicos del cuerpo y nosocomiales; presentándose hasta en un 60% de las infecciones del torrente sanguíneo y de manera adicional, la preocupación aumenta debido a la fármaco resistencia que han desarrollado^{3,9}.

Los microorganismos patógenos como la *C. albicans*, *E. faecalis* y *S. aureus*, son causantes de varios problemas de salud como la candidiasis, el síndrome de *shock* tóxico y la inflamación del endocardio (endocarditis) cuyos casos se presentan en un 50% debido a los estreptococos, un 15% al 30% por *S. aureus*, y en menor porcentaje por enterococos y levaduras^{3,4}.

La cavidad oral (entre otras zonas corporales) reúne las condiciones idóneas para el crecimiento de microorganismos endémicos como *C. albicans*, *E. faecalis* y *S. aureus*, que ante alteraciones del sistema inmunológico o del medio, producen reacciones adversas por su proliferación, de esta manera, estos patógenos se convierten en un foco productor de infecciones problemáticas a la hora de realizar distintos procedimientos odontológicos¹⁸.

Los hongos pueden adoptar diversos estilos de vida en la naturaleza, entre ellos, como simbioses o parásitos¹⁰. Dentro de las levaduras de interés clínico se encuentra la *Candida*, responsable de la candidemia, en países desarrollados es considerada la cuarta causa más común de infecciones nosocomiales en torrente sanguíneo; así, la candidiasis invasiva se le atribuye una tasa de mortalidad de hasta el 47%¹⁹. A pesar de la cantidad de compuestos antifúngicos disponibles como la nistatina y azoles tópicos, se presentan fenómenos de susceptibilidad variable^{20,21}.

Recientemente, la aceptación de la medicina tradicional como una forma alternativa del cuidado de la salud y considerando el desarrollo de la resistencia microbiana a los antibióticos disponibles, motiva a los investigadores a evaluar la actividad antimicrobiana de los productos naturales aislados de las plantas medicinales, los cuales, también ganan terreno en la aplicación en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica, lo que sugiere que el estudio sistemático de estos es muy importante.

Se plantea en este trabajo la evaluación de la actividad antimicrobiana los aceites esenciales de las plantas Anís (*Pimpinella anisum*), salvia (*Salvia officinalis*), naranja (*Citrus sinensis*), cidrón (*Aloysia citriodora*), geranio (*Pelargonium odoratissimum*), ruda (*Ruta graveolens*), poleo (*Hyptis suaveolens*), mandarina (*Citrus reticulata*), hinojo (*Foeniculum vulgare*) y limonaria (*Cymbopogon citratus*), frente a microorganismos patógenos como *C. albicans*, *E. faecalis* y *S. aureus*.

2. JUSTIFICACIÓN

En la búsqueda constante de soluciones para las enfermedades ocasionadas por patógenos que afectan el organismo, el ser humano se ha visto envuelto en el uso indiscriminado de compuestos encargados de inhibir el desarrollo de microorganismos, algunos ejemplos son los derivados azólicos, betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, entre otros; pero esta situación ha conllevado a dos problemáticas; que los compuestos presentan efectos secundarios como malestares leves, hasta toxicidad hepática; y el desarrollo de microorganismos tolerantes a la farmacocinética de dichos medicamentos, dificultando su tratamiento^{22, 23}, por estas razones se buscan nuevas opciones en los productos naturales que reemplacen los compuestos sintéticos.

Asimismo, los aceites esenciales procedentes de las plantas aromáticas, presentan posibles soluciones para las problemáticas referidas anteriormente, en especial por ser de uso común y su cultivo está presente en muchas regiones del mundo; de esta manera se aprovechan los principios de la química verde, donde se trabaja para desarrollar productos eficaces y no tóxicos o dañinos para el ser humano y/o su medio ambiente.

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales obtenidos de algunas plantas aromáticas de uso cotidiano dentro de la población como el Anís (*Pimpinella anisum*), Salvia negra (*Salvia officinalis*), Naranja (*Citrus sinensis*), Cidrón (*Aloysia citriodora*), Geranio (*Pelargonium odoratissimum*), Ruda (*Ruta graveolens*), Poleo (*Hyptis suaveolens*), Mandarina (*Citrus reticulata*), Hinojo (*Foeniculum vulgare*) y Limonaria (*Cymbopogon citratus*), frente a la *C. albicans*, *E. faecalis* y *S. aureus* responsables de enfermedades infecciosas (EI) que afectan la salud oral (y mucosas en general) como la candidiasis y endocarditis.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales de plantas de las familias Verbenaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Geraniaceae, Apiaceae y Poaceae, frente a *C. albicans*, *E. faecalis* y *S. aureus*, empleando el método de microdilución en placa y análisis en *software* especializado para obtener MIC; y posteriormente determinar CI_{50} y CI_{90} .

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los AEs en estado fresco de las plantas *Pimpinella anisum*, *Salvia officinalis*, *Citrus sinensis*, *Aloysia citriodora*, *Pelargonium odoratissimum*, *Ruta graveolens*, *Hyptis suaveolens*, *Citrus reticulata*, *Foeniculum vulgare* y *Cymbopogon citratus*, empleando el método de hidrodestilación asistida por microondas.
- Determinar la composición química de los aceites esenciales bajo estudio empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC –y CI_{50} y CI_{90} –) de los aceites esenciales bajo estudio frente a *C. albicans*, *E. faecalis* y *E. aureus*, mediante el método de microdilución en placa empleando el equipo lector de placas de Elisa.
- Comparar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales vs cuatro compuestos comerciales (vancomicina, ampicilina, itraconazol, fluconazol) empleados para evaluar la resistencia de *C. albicans*, *E. faecalis* y *S. aureus*.

4. MARCO TEÓRICO

La investigación de compuestos de origen natural ha tomado fuerza en los últimos años debido a la búsqueda de nuevas estructuras con actividad biológica que puedan ser empleadas en la industria farmacéutica como alternativa para tratamientos contra microorganismos patógenos²⁴.

Durante muchos años, el uso de las plantas ha sido inspiración para crear medicamentos novedosos, puesto que el uso indiscriminado de fármacos ha contribuido en el desarrollo de mecanismos de tolerancia de microorganismos²⁵. Adicionalmente, está la preocupación por los efectos secundarios que producen los antibióticos, que van desde leves malestares, hasta la muerte²³⁻²⁷

La actividad antimicrobiana es la capacidad de inhibir el desarrollo de un microorganismo, esta inhibición por parte de dicha actividad se obtiene por una amplia variedad de compuestos como los fenoles naturales (carvacol, eugenol y timol). La actividad antibacterial es la propiedad que tienen algunos compuestos de inhibir el crecimiento de los patógenos de origen bacteriano, como el ácido benzoico, el benzaldehído y el ácido cinámico^{26,27}.

En el caso de la actividad antifúngica existen sustancias químicas que afectan la membrana celular de los hongos lo que puede impedir el crecimiento de estos, un ejemplo de ello es el caso de la formación de radicales libres del tiocianato reactivo^{26,27}.

Con el estudio de la actividad antimicrobiana de los AEs, se han adoptado técnicas para detectar y/o evaluar su potencial frente a diferentes microorganismos. Así, las técnicas de detección que se emplean con frecuencia son las de dilución y difusión; la primera se considera un método cuantitativo y la segunda cualitativo, puesto que solo indica la presencia o ausencia de una sustancia antimicrobiana¹¹.

Después de las técnicas de detección, se presentan las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (*Antimicrobial Susceptibility Testing –AST-*), las cuales se emplean para determinar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos o para detectar

cepas resistentes²⁸. Al evaluar compuestos de origen natural, se emplean las AST para establecer la eficacia que puedan tener contra patógenos. Al igual que las técnicas de detección, las AST pueden ser clasificadas en métodos de difusión (como difusión en agar y bioautobiografía) y dilución (como microdilución en caldo y dilución en agar)^{24,29}.

Una de las aplicaciones adicionales de las AST, es la de establecer que tan alto es el potencial de un antimicrobiano ante un microorganismo, mediante la búsqueda de su concentración mínima inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration* –MIC-). La MIC es la concentración más baja de un antimicrobiano, que es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo; los resultados que se obtienen, se miden de manera cuantitativa ($\mu\text{g/ml}$) y se realiza interpretación cualitativa según los valores que resulten y se clasifican en: susceptible (S), intermedio (I), resistente (R), dosis sensible dependiente (SD) o no interpretado (NI)^{30,31}.

La MIC puede ser determinada en placas de crecimiento de medio sólido o en métodos de dilución en caldo. La dilución en caldo se realiza mediante la siembra de dosis idénticas de bacterias en múltiples pozos que contienen concentraciones de un fármaco; estas siembras pueden ser realizadas en un lector de microplacas ELISA (*Enzyme- Linked Immunosorbent Assay*)³².

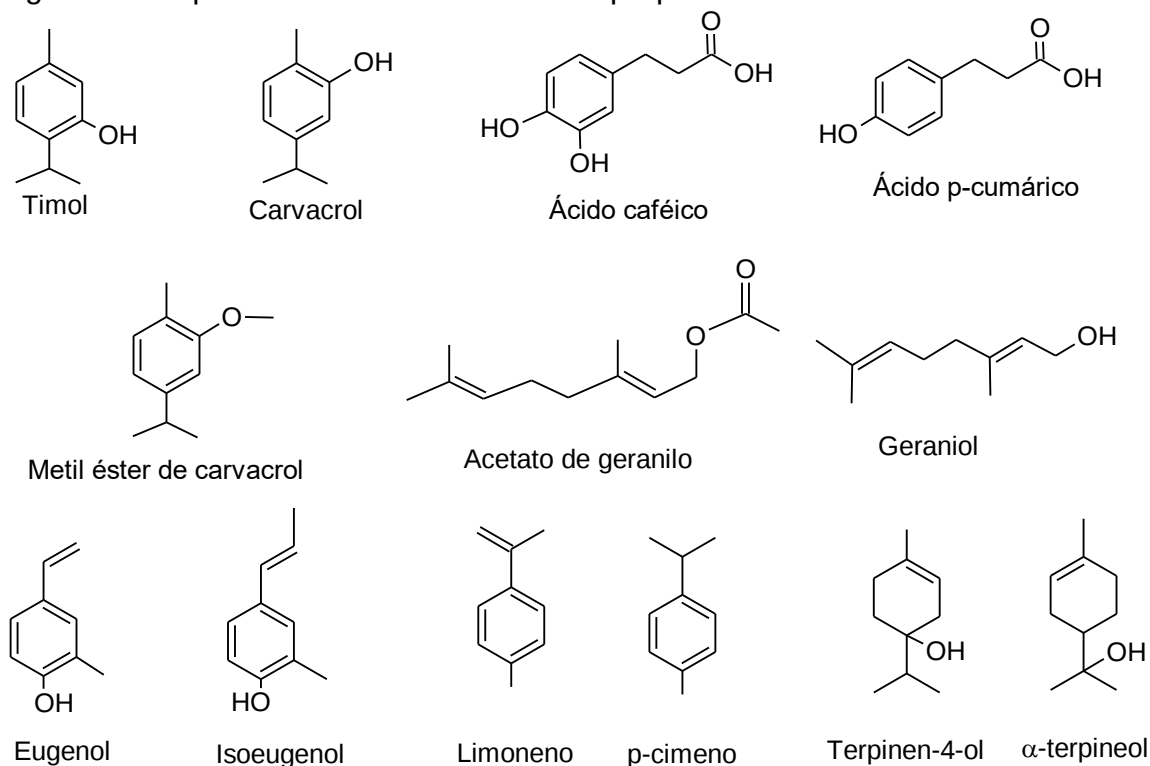
4.1. ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

La mayoría de los estudios disponibles en literatura relacionados con antimicrobianos derivados de plantas involucran además la actividad antioxidante de hierbas, especias y sus compuestos, los cuales han sido empleados desde la antigüedad como saborizantes y conservantes de alimentos y en la medicina tradicional³³.

Los aceites esenciales o quinta esencia son los responsables de la fragancia de las plantas. Estos aceites son metabolitos secundarios altamente enriquecidos en compuestos con estructura de isopreno (Figura 1). Estos compuestos se conocen como terpenos, su fórmula molecular es $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$. Se presentan como diterpenos, triterpenos y tetraterpenos (C_{20} , C_{30} , y C_{40}), como también hemiterpenos (C_5) y sesquiterpenos (C_{15}). Cuando estos compuestos contienen oxígeno dentro de su estructura reciben el nombre de terpenoides³⁴.

Otros metabolitos secundarios presentes en las plantas son los fenoles o sus sustituyentes derivados como ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides y alcaloides. Las variaciones en la configuración estructural y la composición química de estos compuestos favorecen los diferentes modos de acción en su actividad biológica.

Figura 1 Compuestos con estructura de isopropeno³³



La acción inhibitoria de los compuestos naturales en este caso de algunos aceites esenciales se atribuye a la presencia del grupo hidroxilo (-OH) de los compuestos fenólicos, ya que estos pueden interactuar con la membrana celular de las bacterias ocasionando ruptura de la misma. Un ejemplo de estos compuestos y su actividad antimicrobiana son el timol y carvacrol. Los grupos hidroxilo promueven la deslocalización de los electrones que actúan como intercambiadores de protones y reducen el gradiente a través de la membrana citoplasmática de las células bacterianas, ocasionando su muerte³³.

Los terpenos o terpenoides son activos contra microorganismos tipo bacteria, fungi, virus y protozoo. En 1977, Cowan reportó que el 60% de derivados de aceites esenciales (como los fenoles hidroxilados) evaluados a la fecha, presentaron inhibición a fungi y 30% a bacterias³⁴.

En el desarrollo de este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales obtenidos de las siguientes especies vegetales, clasificadas de acuerdo con la familia a la cual pertenecen:

- **Lamiaceae** (*Hyptis suaveolens*, *Salvia officinalis*) muchas de las especies pertenecientes a esta familia son importantes económicamente como ornamentales, especias, perfumes, farmacología y en la medicina tradicional; sus AEs se conocen por propiedades antigripales, antipiréticas, antiespasmódicas, antidiarreicas, antibacterianas, entre otras^{35,36}.
- **Rutaceae** (*Ruta graveolens*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*) es una familia frecuente en la industria farmacéutica, alimentaria y en la ornamental. De sus AEs se han aislado, principalmente, alcaloides, cumarinas y algunos tipos de lignanos; estas características dan paso a una amplia variedad de actividades biológicas. Entre sus estudios, se frecuentan aquellos para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, afecciones endocrinológicas y el cáncer, entre otras³⁷.
- **Verbenaceae** (*Aloysia citridora*) son especies que poseen diversos usos que dan interés económico como en la gastronomía y la medicina tradicional, donde es usada en infusiones; sus AEs poseen actividad antimicrobiana, antiplasmodia y efectos de relajación muscular³⁸.
- **Geraniaceae** (*Pelargonium odoratissimum*) son especies cultivadas para usos ornamentales y de perfumería; se emplea como astringente y como regulador de la presión arterial en la medicina popular³⁹.
- **Poaceae** (*Cymbopogon citratus*) son una familia importante en la economía y ecología; algunas de sus especies proporcionan cereales y es la mayor parte del azúcar mundial. Algunas se emplean en la industria alimentaria, en perfumería, en la fabricación de bebidas, entre muchas otras. Se conocen propiedades diuréticas^{40,41}.
- **Apiaceae**: (*Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*) esta familia es cultivada por su importancia en la industria alimentaria y farmacéutica⁴².

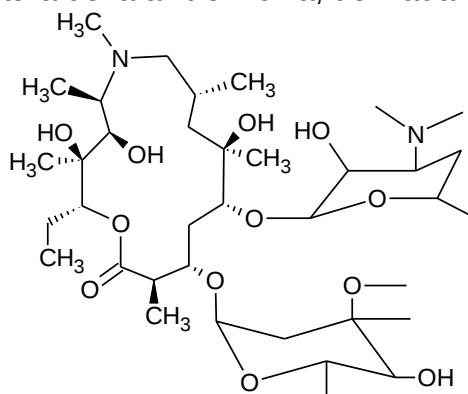
4.2. COMPUESTOS SINTÉTICOS EMPLEADOS EN EL CONTROL DE *C. albicans*, *S. aureus* y *E. faecalis*.

Los microorganismos se clasifican en cuatro grupos principales: virus, parásitos, hongos y bacterias, cada uno con características específicas o únicas, como la inmunidad, resistencia, reproducción, etc; que ayudan a determinar su clasificación, estos grupos poseen microorganismos patógenos que invaden y se multiplican en el huésped y son causantes de enfermedades infecciosas, debido a su capacidad de disminuir o suprimir el sistema inmunológico de este⁴³.

Debido a las distintas enfermedades producto de los patógenos, con el paso del tiempo surgieron diversos compuestos sintéticos empleados en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, como *C. albicans*, *S. aureus* y *E. faecalis*, sin embargo, algunos han perdido su eficacia debido a la resistencia adquirida de las cepas, lo cual ha aumentado el interés por soluciones de origen natural⁴³.

El *Staphylococcus aureus* es conocido por producir infecciones nosocomiales, es una bacteria Gram positiva de carácter aerobio endémica de la piel y mucosas⁴⁴; causa infecciones en piel, tejidos blandos, vías respiratorias, articulaciones y produce trastornos endovasculares. Para su tratamiento se utilizan antibióticos como la meticilina, vancomicina y penicilinas⁴⁴, aunque también se ha hecho popular el uso de azitromicina (Figura 2), un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos –linconsamida- estreptograminas (MLS); el cual posee un mecanismo de acción que se centra en la inhibición de la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 50S del ribosoma²².

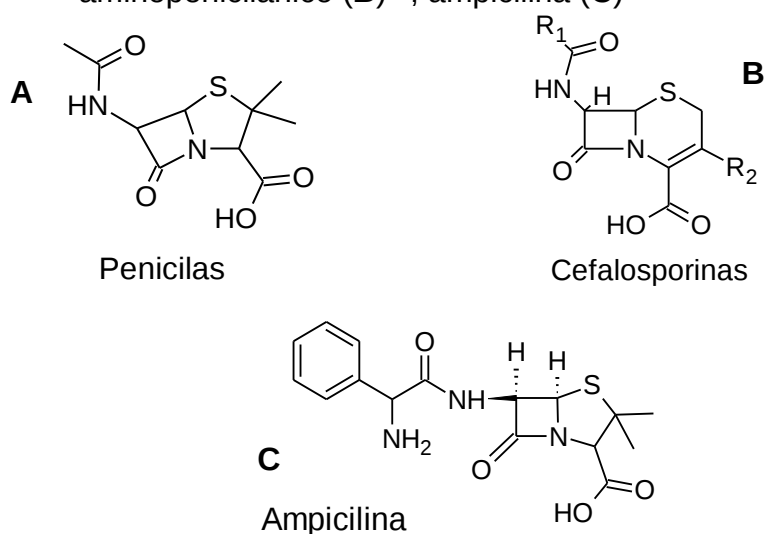
Figura 2 Estructura de la azitromicina, derivada de eritromicina⁴⁵



Asimismo, las bacterias Gram positivas como el *Enterococcus faecalis*, se organizan en pares o cadenas cortas y son endémicas de la flora gastrointestinal de animales y humanos, también se encuentra en el tracto urinario femenino; su crecimiento se da en presencia de NaCl al 6.5% y tolera temperaturas entre de 10 a 45°C⁴⁶. Para su tratamiento se utilizan cefalosporinas, clindamicina, lincomicina y aminoglucósidos ⁴⁷⁻⁵².

Las cefalosporinas son medicamentos betalactámicos, al igual que la ampicilina, cuyo mecanismo se refleja en la inhibición de la síntesis de peptidoglucano, iniciando los procesos de lisis y muerte bacteriana^{53,54}. Las cefalosporinas poseen similitud con las penicilinas, pero con un espectro mayor debido a su estabilidad frente a β -lactamasas bacterianas y su núcleo activo de ácido 7-aminocefalosporánico como se muestra en la Figura 3^{53,55}.

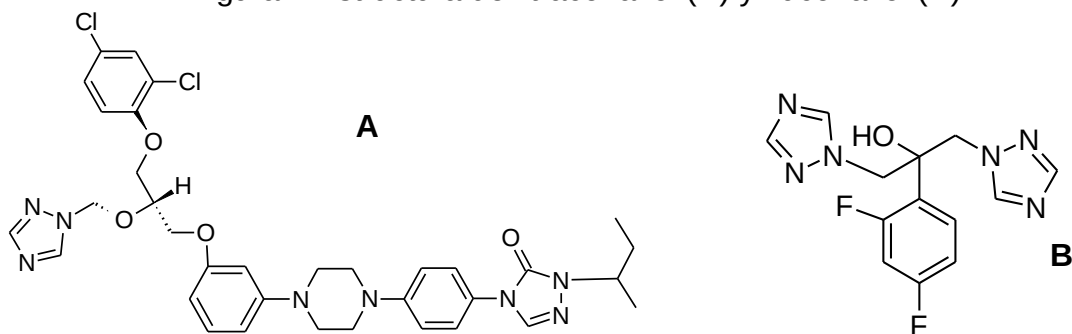
Figura 3 Estructura de ácido 7-aminocefalosporánico (A), ácido 6-aminopenicilánico (B)⁵⁶, ampicilina (C) ⁴⁵



La *Candida albicans* es una levadura anaerobia formadora de colonias. Es endémica de la cavidad oral, tubo digestivo, vagina y medio ambiente, se desarrolla a 25°C como hongo y a 37°C como levadura. Se encuentra relacionada con la estomatitis por prótesis removibles y agrava la glositis media romboidal, además, de ser la causante de la candidiasis⁵⁷⁻⁵⁹.

Los medicamentos más comunes empleados para combatirla son los azoles, como el itraconazol (Figura 4), los cuales, afectan la membrana celular, inhibiendo la enzima nosterol 14- α demetilasa en el citocromo P-450-3-A de los hongos, impidiendo la conversión de lanosterol a ergosterol, con lo cual se pierde la integridad de la membrana fúngica^{21,60-62}.

Figura 4 Estructura del itraconazol (A) y fluconazol (B)⁴⁵

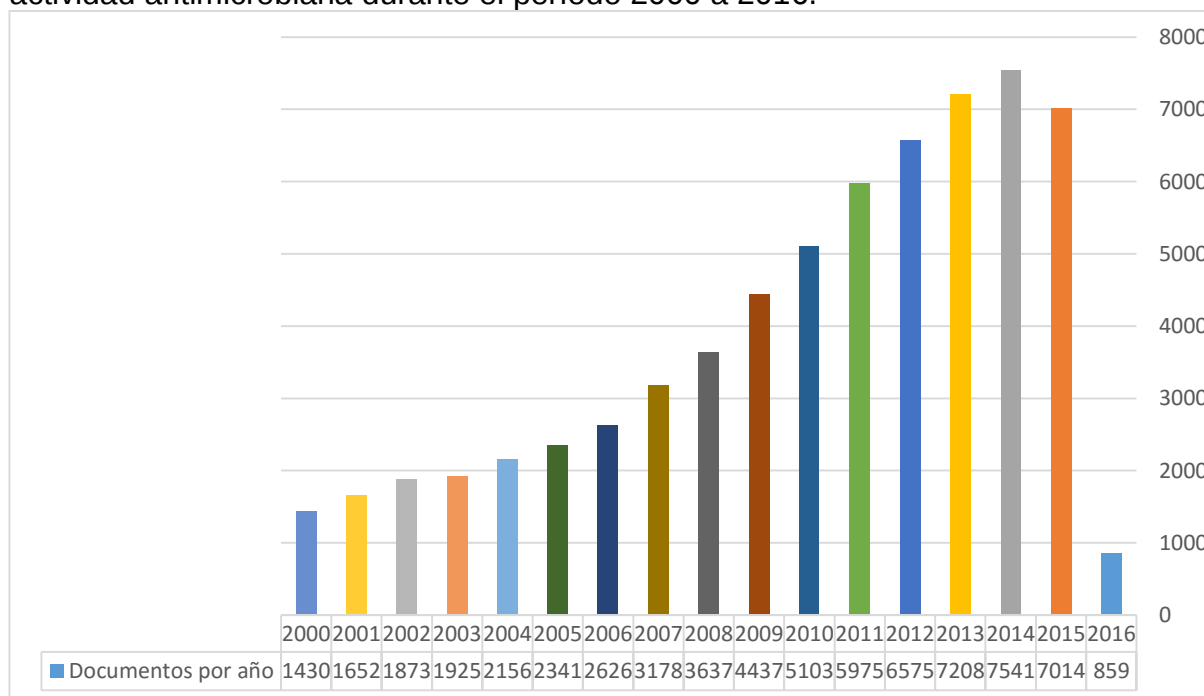


5. MARCO DE ANTECEDENTES

El uso de compuestos de origen natural, ha sido tradicional desde los inicios de la medicina; en la actualidad, estas sustancias han tenido nuevamente una fuerte acogida debido a la resistencia adquirida de los microorganismos y los efectos secundarios debido al uso de medicamentos sintéticos convencionales. Por estos motivos, el empleo de compuestos derivados naturales se ha considerado como alternativa viable en el tratamiento de enfermedades infecciosas como la candidiasis, realizando estudios de sus actividad biológicas, como es el caso de la investigación del potencial de los AEs^{24,63}.

Con el fin de establecer la importancia de las investigaciones relacionadas con la actividad, se realizó una consulta empleando la siguiente ecuación de búsqueda en la base de datos de Scopus (*TITLE-ABS-KEY ("antimicrobial activity") AND DOCTYPE (ar) AND PUBYEAR > 1999*); donde se obtuvieron 65530 resultados en el periodo 2000-2016 (a la fecha -25 de Febrero-). En la Figura 5 se puede apreciar la dinámica científica medida por el número de artículos distribuidas por año.

Figura 5 Distribución de número de publicaciones por año relacionadas con actividad antimicrobiana durante el período 2000 a 2016.



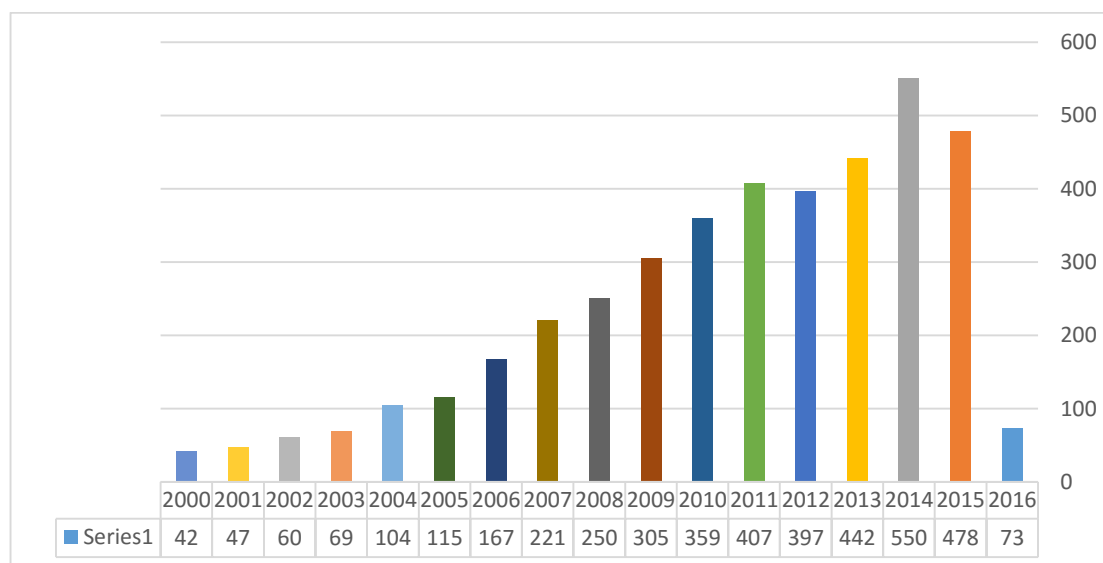
Fuente: Base de datos Scopus, (Elsevier, B.V., 2016)

En la Figura 5 se evidencian aspectos como la tendencia creciente, el año de mayor número de publicaciones es el año 2014 con 7541 artículos, y se observa como en el presente año ya se superan las 859 publicaciones.

En cuanto a la relación entre la actividad antimicrobiana y los aceites esenciales, se estructuró la siguiente ecuación de búsqueda (*TITLE-ABS-KEY (“antimicrobial activity”) AND TITLE-ABS-KEY (“essential oil*”) AND DOCTYPE (ar) AND PUBYEAR > 1999*), obteniendo como resultado 4086 artículos publicados.

En la Figura 6, se observa una tendencia creciente en el estudio de la relación de la actividad antimicrobiana con los aceites esenciales. El 2014 fue el año de mayor actividad con 550 publicaciones. En lo corrido del año se han publicado 73 artículos, lo que muestra la relevancia que tiene este tema en la actualidad.

Figura 6 Distribución de número de publicaciones por año relacionadas con actividad antimicrobiana y aceites esenciales de acuerdo con la ecuación de búsqueda propuesta.



Fuente: Base de datos Scopus, (Elsevier, B.V., 2016)

Nantitanon y colaboradores (2007) estudiaron el AE de *Hyptis suaveolens* obtenido por hidrodestilación, y examinaron sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. La actividad antimicrobiana se evaluó por los métodos de difusión y dilución. Los resultados muestran que el potencial antifúngico es más fuerte que el antibacteriano. Su actividad inhibitoria del crecimiento de hongos fue dependiente de la dosis con un valor de MIC de 1: 640. También se observó una disminución de la actividad cuando el aceite se almacena a altas temperaturas (> 40°C)⁶⁴.

Andrade *et. al* (2013) estudiaron la composición química de *Pelargonium Odoratissimum* y determinaron su actividad antimicrobiana frente a los hongos *Aspergillus flavus* LMC 1816, *Aspergillus carbonarius* LMC 1815 y *Aspergillus parasiticus* LMC 817 y las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25 992. El AE se aisló por destilación usando un equipo tipo Clevenger, se realizó la identificación de sus constituyentes y se cuantificaron mediante GC/MS y análisis de GC-FID. Para los ensayos *in vitro* se trabajó con un diseño completamente al azar. Las concentraciones de AE variaron de 0,1 a 2 µL.mL⁻¹ (en DMSO) para hongos y de 1 a 500 µL.mL⁻¹ para bacterias. El AE de las hojas de *P. odoratissimum* provee metileugenol (96,80%). Se observó una inhibición del 100% de crecimiento en hongos y exhibió un efecto pequeño sobre las bacterias a las concentraciones ensayadas⁶⁵.

Juárez y sus colaboradores (2010) estudiaron la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis*, obtenido por el método de hidrodestilación con arrastre de vapor, la composición química se determinó por CG-MS y la actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar, uno de los microorganismos en estudio fue *S. aureus*. Los resultados obtenidos fueron: componentes mayoritarios limoneno, b-linalol y decanal y el halo inhibitorio fue de 25mm⁶⁶.

Guerra *et. al* (2014) estudiaron la actividad antimicrobiana de la corteza de *C. sinensis* frente a los microorganismos Gram-negativas (*E. coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), y Gram-positivos (*S. aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115) usando el método de difusión en disco de *Bauer-Kirby*; emplearon concentraciones de aceite diluido en etanol: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Los resultados mostraron que las cepas Gram-positivas fueron 100% resistentes al aceite puro y las Gram-negativas mostraron sensibilidad al 10%. Finalmente, procedieron a determinar la MIC de los patógenos sensibles por el método de dilución en caldo a concentraciones inferiores (5, 6, 7, 8 y 9%) a las obtenidas por el método *Bauer-Kirby*. La MIC para la *P. aeruginosa* y *E. coli* fueron 9 y 10%, respectivamente⁶⁷.

Shahzad *et. al* (2009) estudiaron la actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante del AE de *Citrus reticulata*, extraído por destilación con arrastre de vapor. La actividad antimicrobiana fue ensayada por el método de difusión en disco, empleando las bacterias *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* y los hongos *Aspergillus niger*, *Flavis Aspergillus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ficuum*, *Fusarium Saloni*. Los resultados mostraron que la zona máxima de inhibición para *E. coli* y *S. typhimurium* fue de 25mm, seguido de *A. niger* con 19,6 mm. La zona de mínima inhibición fue para *F. solani* con 9mm. Las zonas de inhibición, medida después de 48 horas y 96 horas, mostraron que es activo contra todas las bacterias y los hongos ensayados⁶⁸.

Haşimi y colaboradores (2014) investigaron los componentes, actividad antimicrobiana y propiedades antioxidantes del AE extraído de las semillas de *Pimpinella anisum* L. y *Cuminum cyminum* L. Determinaron los componentes por CG/EM y obtuvieron que los compuestos principales del anís fueron trans-anetol (52,94%), seguido de iso-anetol (13,89%), óxido de cariofileno (8,55%) y cariofileno (29,4%); los componentes principales del aceite esencial de comino fueron β -pineno (15,77%), α -terpineno (15: 52%), 1-fenil-1-butanol (15: 13%), aldehído cumínico (12,74%). La actividad antimicrobiana fue determinada por el método de difusión en disco frente a *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y la levadura *Candida albicans* ATCC10231. El aceite esencial de anís mostró una débil actividad antimicrobiana. El AE de comino mostró una fuerte actividad antimicrobiana frente a *C. albicans* con un $22 \pm 0,9$ mm de diámetro de la zona de inhibición. *P. aeruginosa* mostró resistencia a los aceites esenciales⁶⁹.

Bersan *et. al* (2014) estudiaron la actividad antimicrobiana de 20 plantas aromáticas y medicinales de Brasil pertenecientes a las familias Verbenaceae, Astaraceae, Poaceae, Lamiaceae y Cyperaceae sobre los agentes patógenos *Candida albicans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*, empleando el método de microdilución en placa. Como resultado se obtuvo que la MIC varía entre valores de 0.007 a 1.00 mg/mL, la planta que presentó mejores resultados inhibitorios fue la *Cyperus articulatus* de la familia Cyperaceae con 63.96% frente a *S. sanguis*.⁷⁰

Ahman *et. al* (2015) estudiaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y su combinación sinérgica con el ión Ag⁺. Determinaron la composición química de seis AE de diferentes especies de *Cymbopogon* mediante

el método de CG/EM y como resultado confirmaron la presencia de nerol, geraniol geranial como los principales compuestos volátiles. La actividad antimicrobiana a probaron frente a bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*), Gram-negativas (*E. coli* y *Moraxella catarrhalis*) y las levaduras (*C. albicans* y *C. tropicalis*). La naturaleza de las interacciones potenciales la determinaron mediante índices de concentración inhibitoria fraccional (FICIs) calculado a partir de los ensayos de microdilución y curvas de letalidad. La MIC del AE y Ag + contra todos los patógenos probados varió de 0,032 mg/ml a 1 mg/ml y 0,004 y 0,064 mg/ml respectivamente, pero al ensayar en combinación los valores FICI se redujeron a un rango entre 0,258 y 2,186, lo que indica sinergia. La mejor interacción fue entre *C. flexuosus* y Ag + frente a *C. albicans* con $\Sigma FIC = 0,254$ ⁷¹.

Khalil *et. al* (2011) estudiaron el aceite esencial de *Salvia officinalis* L. analizando plantas colectadas a distintas alturas; se analizaron sus componentes por CG/EM y observaron que las etapas de desarrollo y los factores ecológicos tuvieron impacto sobre la composición del AE, aun así, los principales componentes fueron 1,8-cineol, alcanfor, borneol, α -pineno, β -pineno, canfeno, β -mirceno y cariofileno con variación en los porcentajes de acuerdo a la altitud de colecta. La actividad antibacteriana fue probada frente a *S. aureus* y *Streptococcus* del grupo D, donde se presentó inhibición de estos microorganismos tras diez minutos con una concentración de 20l/ml de AE. El efecto inhibidor frente a *Candida albicans* fue total y definitiva dentro de un mínimo de tiempo a la misma concentración. Sin embargo, el aceite esencial mostró un efecto bacteriostático temporal en *E. coli*, *Salmonella typhi*, así como *Pseudomonas aeruginosa*. En comparación con los antibióticos más conocidos, la eficiencia del AE de *S. officinalis* fue mucho mejor, especialmente contra bacterias resistentes a los antibióticos⁷².

Mota *et. al* (2015) estudiaron la composición química y la actividad antimicrobiana del AE obtenido por hidrodestilación (rendimiento entre 1,1 y 2,9%) de los frutos de *Foeniculum vulgare*. La composición fue establecida por CG/FID y CG/EM, los principales compuestos fueron fenchone (16,9 - 34,7%), estragol (2,5 - 66.0%) y trans-anetol (7,9 - 77,7%). La actividad antifúngica de los aceites esenciales la evaluaron frente a seis hongos: *Aspergillus niger*, *A. japonicus*, *A. oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *oryzae Rhizophus* y *R. stolonifer*. La actividad antibacteriana se evaluó contra tres cepas Gram-positivas: *E. faecalis* ATCC 29212, ATCC 12228 *S. epidermidis* y *S. aureus* ATCC 28213; y en contra de seis cepas Gram-negativas: *E. coli* ATCC 25922; *Morganella morganii* GRS 08; *Proteus mirabilis* GRS 04; *Salmonella enteritidis* GRS 05; *S. Typhimurium enteritidis* serovar GRS 06 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión en agar disco; determinaron la MIC utilizando el método de caldo de macro-dilución. Los valores MIC variaron de 62,5 (*E. coli* ATCC 25922) a 2000 μ g/ml (*P. aeruginosa* ATCC 27853)⁷³.

Haddouchi *et. al* (2013) investigaron los efectos antibacterianos y antifúngicos de los AEs de cuatro plantas, *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens* y *Ruta tuberculata*, frente a cepas bacterianas y fúngicas estándar. Los compuestos químicos de los aceites fueron examinados por GC/EM. Los resultados revelaron una potente actividad antifúngica contra hongos filamentosos. *Aspergillus fumigatus* y *Cladosporium herbarum* fueron las cepas más sensibles con valores de MIC inferior a 3,5 μml^{-1} para ciertos aceites, alcanzando el 7,8 μml^{-1} para la otra⁷⁴.

Al-Deen *et. al* (2015) estudiaron el AE extraído de hojas frescas de *Aloysia citriodora* y analizaron su composición por CG/EM y obtuvieron que los componentes principales eran citral (geranial y neral), limoneno, β -cariofileno, limoneno, germacreno D, Ar-curcumeno, γ -elemene, 1,8-cineol, cedreno y óxido de β -cariofileno. La actividad antimicrobiana del AE la estudiaron por el método de difusión en disco obteniendo que *E. coli* es más sensible que los *S. aureus* y *S. typhimurium*, y determinaron que la actividad antimicrobiana se debía al citral, presentándose variaciones de acuerdo al porcentaje del mismo que dependió de las fechas de colecta⁷⁵.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente a *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, se realizó en varias etapas, las cuales se describen a continuación:

6.1. OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Para la obtención de los aceites esenciales se empleó material fresco proveniente de las plazas de mercado de la ciudad de Bucaramanga de las siguientes plantas: *Salvia officinalis*, *Citrus sinensis*, *Pimpinella anisum*, *Aloysia citriodora*, *Pelargonium odoratissimum*, *Ruta graveolens*, *Hyptis suaveolens*, *Citrus reticulata*, *Foeniculum vulgare* y *Cymbopogon citratus*.

En el caso de *Salvia officinalis*, *Aloysia citriodora*, *Pelargonium odoratissimum*, *Ruta graveolens*, *Hyptis suaveolens*, *Foeniculum vulgare* y *Cymbopogon citratus* se utilizó toda la planta, es decir, hoja, tallos y flores, en caso de tenerlas; de *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata* se utilizó la cáscara de la fruta y de *Pimpinella anisum* se usó la semilla. El material vegetal empleado se presenta en la Figura 7.

Figura 7. Material vegetal empleado para la extracción de aceites esenciales.

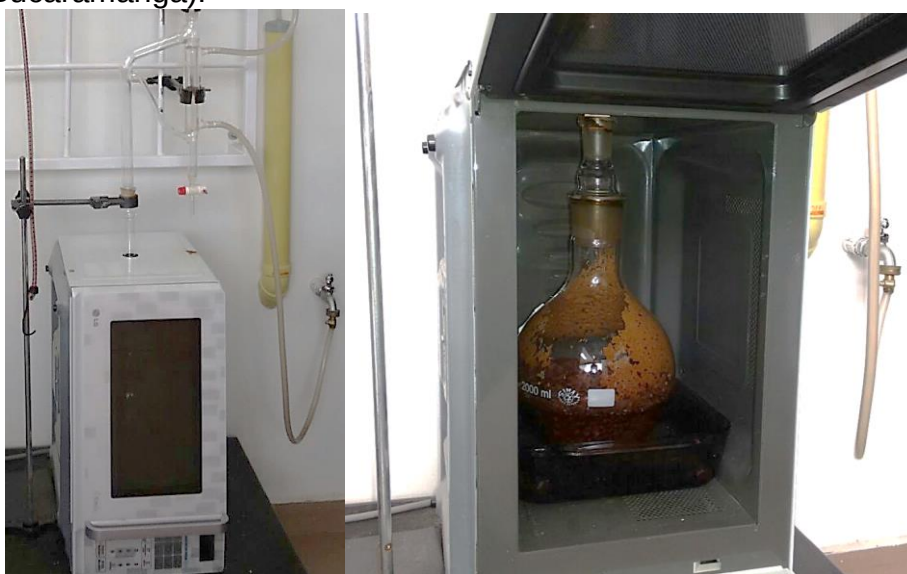


Fuente: Autores.

El aceite esencial de estas plantas se obtuvo mediante hidrodestilación asistida por microondas en tiempos de extracción de 30 minutos, con tres repeticiones e intervalos de 15 minutos; se empleó un equipo de destilación tipo *clevenger* unido a una trampa *Dean-Stark*, acoplado a un horno microondas marca LG (potencia 800W y 2.5 GHz).

En la Figura 8 se observa el montaje para la hidrodestilación asistida por microondas; al lado izquierdo se observa la parte externa del equipo con el horno microondas y la adaptación con el *Dean-Stark*; y a la derecha se aprecia el equipo en su interior con el balón y el adaptador.

Figura 8 Equipo de hidrodestilación asistida por microondas (disponible en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Química Ambiental, U. Santo Tomás, Bucaramanga).



Fuente: Autores.

Se realizaron réplicas de extracción para cada planta hasta obtener los volúmenes necesarios de aceites esenciales para los ensayos (aproximadamente 2mL). El rendimiento de extracción para cada AE se calculó de acuerdo con la Ecuación 1.

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del rendimiento

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{gramos de AE obtenido}}{\text{gramos de biomasa}} \times 100$$

6.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Los aceites esenciales de las plantas bajo estudio se analizaron en un cromatógrafo de gases Trace 1310 acoplado a un detector selectivo de masas ISQ (*Thermo Fisher Scientific, Inc.*), con inyector *split/splitless* (relación split 1:20) y columna Rxi®-1MS (30m x 0.25 mm D.I. x 0.50 µm d.f., Restek Co., Bellefonte) con fase estacionaria 100% dimetil-polisiloxano.

La rampa de calentamiento utilizada en el horno cromatográfico fue: 50°C (5 min) a 2°C/min hasta 150°C (10 min) y a 3°C/min hasta 250°C (5 min). Los espectros de masas se obtuvieron por ionización electrónica (EI, 70 eV) en un analizador másico cuadrupolar con rango de masas m/z 40-350, en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). Las temperaturas de la fuente de iones y línea de transferencia fueron 230°C y 250°C, respectivamente. Los datos cromatográficos y espectroscópicos se procesaron con el software *Thermo Xcalibur™* (Versión 2.2 SP1.48, *Thermo Fisher Scientific, Inc.*).

Los índices de retención fueron obtenidos usando los datos de hidrocarburos alifáticos saturados entre C₇- C₃₅. La identificación de los metabolitos secundarios fue realizada por comparación de los espectros de masas con las bases de datos *NIST11*, *NIST Retention Index* y *Wiley9* y por comparación de los índices de retención reportados en la literatura⁷⁶.

6.3. COMPUESTOS DE REFERENCIA EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Con el fin de determinar el grado de efectividad de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales propuestos para este estudio, se emplearon compuestos de referencia disponibles comercialmente como la ampicilina, vancomicina, fluconazol e itraconazol y para los cuales fue necesario realizar una etapa previa de purificación (exceptuando ampicilina y vancomicina puesto que no se pueden purificar en condiciones normales de laboratorio), se utilizaron los reactivos etanol absoluto (Casa comercial: Merk; 99,9% de pureza) y acetona (Casa comercial: Burdick&Jackson; 99,97% de pureza) grado analítico. Los medicamentos utilizados fueron ampicilina, fluconazol e itraconazol.

Fluconazol: se empleó el medicamento de nombre comercial Batén Bussié® de dos cápsulas (150mg c/u). Para su purificación se vertió el contenido de las dos cápsulas en un vaso de precipitado, al cual se le añadieron 60mL de etanol y se calentó a 60°C con agitación constante por 15 minutos. Posteriormente, se realizó el proceso de filtrado por gravedad con papel filtro cualitativo. Posteriormente se rotoevaporó y se añadieron 25mL de acetona, luego se rotoevaporó nuevamente. Finalmente, se guardó lo obtenido en un vial *eppendorf*.

Itraconazol: se empleó el medicamento de nombre comercial Itrol Suiphar® y se maceraron seis cápsulas de 100mg c/u. El contenido se maceró y posteriormente se disolvió en 30mL de acetona, dejando en reposo por 24h. Finalmente, se filtró por gravedad con papel filtro cualitativo y se rotoevaporó hasta obtener un precipitado blanco en las paredes del balón. El precipitado se pasó a un vial *eppendorf* y se almacenó.

Respecto a la ampicilina y vancomicina se trabajaron sin purificar puesto que la reactividad de sus estructuras impide su purificación en condiciones normales de laboratorio, estos compuestos se pulverizaron y almacenaron en viales *eppendorf* y se protegieron de la luz.

Se determinó el punto de fusión de fluconazol e itraconazol por triplicado y se realizó espectroscopia infrarroja (IR Shimadzu, modelo IRA Affinity-1 con transformada de *Fourier*) donde se reportaron las bandas de absorción expresadas en cm^{-1} . Las longitudes de onda de los compuestos purificados son de Fluconazol: 210nm; Itraconazol: 264nm^{77,78}.

6.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES

La determinación de la actividad antimicrobiana para cada uno de los aceites esenciales sobre los microorganismos de estudio (*Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*), se llevó a cabo según lo estipulado en la *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A3 (NCCLS)⁷⁹ y en el protocolo del Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas.

Se prepararon las soluciones *stock* con las concentraciones para cada aceite, para ello, en viales *ependorf* se adicionaron los AEs y 1ml de DMSO al 99%; seguidamente se agitó en vortex, posteriormente se tomó una alícuota y se diluyó en caldo de cultivo Müller- Hinton; se realizaron dos diluciones seriadas de 1:5 para una concentración máxima del 4% de DMSO en el primer pozo, la cual no es tóxica para los microorganismos.

Para los medicamentos de referencia, se preparó una solución acuosa del *stock* de fluconazol a una concentración inicial de 1280 µg/ml. La solución *stock* de itraconazol se preparó a una concentración inicial de 1600µg/ml en DMSO. Posteriormente, se siguió el procedimiento establecido en la CLSI M27-A3⁷⁹ para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. En la Tabla 1 se presentan los rangos de concentración para los compuestos evaluados.

Tabla 1. Rango de concentración de compuestos de referencia y aceites esenciales evaluados.

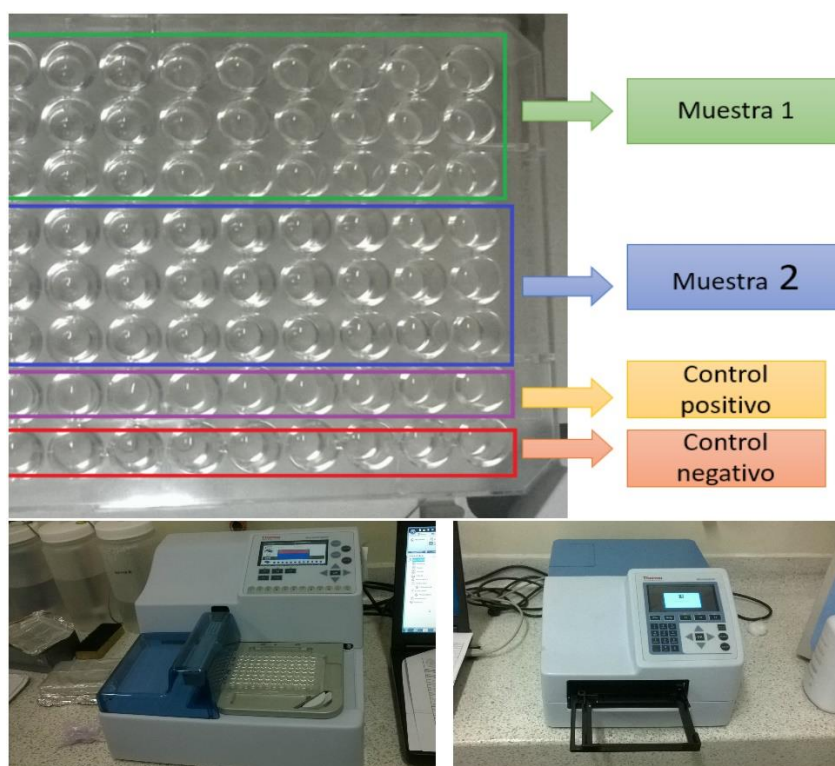
Compuestos	Concentración inicial (µg/ml)	Concentración final (µg/ml)
Fluconazol	64	0,12
Itraconazol	16	0.03
Vancomicina	512	0,25
Ampicilina	64	0,03
Mandarina (<i>C. reticulata</i>)	20,08	0,0097
Anís (<i>P. anisum</i>)	20,01	0,0097
Naranja (<i>C. sinensis</i>)	20,01	0,0097
Hinojo (<i>F. vulgare</i>)	20	0,0097
Limonaria (<i>C. citratus</i>)	20,008	0,0097
Salvia (<i>S. officinalis</i>)	20,018	0,0097
Menta (<i>H. suaveolens</i>)	12,016	0,0058
Ruda (<i>R. graveolens</i>)	12,058	0,0058
Cidrón (<i>A. citriodora</i>)	10	0,0048
Geranio (<i>P. odoratissimum</i>)	12	0,0058

Fuente: Autores

Para el inóculo se utilizaron cultivos de 24 horas de las cepas ATCC 29212 (*E. faecalis*), ATCC 25923 (*S. aureus*) sembrados en agar *enterocococel* (BD), nutritivo (Scharlau) y sangre (Scharlau); y la cepa ATCC 60193 (*C. albicans*) en agar *Sabourand* (Oxoi) y nutritivo; todos incubados a 37°C.

Las siembras fueron realizadas en placas de Elisa de 96 pozos utilizando caldo Müller-Hinton (Dibico) para las bacterias y RPMI 1640+Tampon MOPS (Sigma-Aldrich) para la levadura. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24h y estuvieron cubiertas para evitar la contaminación cruzada en la incubadora, en la Figura 9 se presenta el diseño de la placa, donde las muestras 1 y 2 corresponden a los aceites esenciales (dos aceites por placa, sembrados por triplicado); el control positivo contiene caldo de cultivo y el microorganismo de control y el control negativo contiene solo caldo de cultivo.

Figura 9 Arriba. Diseño de siembra en placa de Elisa de 96 pozos. Abajo der. *Wellwash™ microplate washer*. Abajo Izq. *Multiskan™ FC microplate Photometer* (disponible en el Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas, U. Santo Tomás, Bucaramanga).



Fuente: Autores.

La siembra de los aceites esenciales se realizó con micropipeta, tomando 100µl de la solución madre que se añadió en el primer pozo y luego se tomaron 50µl de este y se realizaron diluciones seriadas hasta el pozo 12. Las concentraciones iniciales y finales de los AEs se presentan en la Tabla 1.

Después de 24 horas y 36 horas (Solo para *C. albicans*) de incubación se procedió a la lectura de las placas; para determinar la MIC se realizó lectura visual con una lámpara de luz visible y espectrofotométrica empleando el equipo de Elisa (*ThermoFisher scientific, Multiskan™ FC Microplate Photometer*) a una longitud de onda de 406, 440 y 530nm para *E. faecalis*, *S. aureus* y *C. albicans* respectivamente con tres repeticiones de lectura, se empleó el *software Thermo Scientific™ Skanit Software 3.1 Research Edition for Multiskan FC* que viene junto al equipo de Elisa. Para la CBM y CFM se realizaron siembras en medio nutritivo, agar sangre, agar sabourand y enterococcosel y se realizó la determinación a las 24h siguientes, verificando que no hubiese contaminación.

La siembra en las cajas de Petri para determinar la CBM y CFM se realizó seleccionando diferentes pozos de las placas de Elisa de forma que fueran mínimo cuatro siembras por aceite; así, se seleccionaron los pozos en donde visualmente no hubo crecimiento y pozos aledaños a este. Pasadas las 24h de incubación de las cajas de Petri, se observó si hubo crecimiento o no en las concentraciones elegidas.

Para la determinación de CI_{50} y CI_{90} se utilizó el software XLfit versión 5.4.0.8 (*Copyright © 2006-2014 ID Business Solutions Limited*), el cual emplea los datos obtenidos del software de Elisa para calcular los valores aproximados que corresponden a porcentajes de inhibición de cada compuesto; asimismo, el XLfit calcula los valores de CI_{50} y CI_{90} permitiendo conocer los porcentajes de inhibición aproximados según la turbidez de los pozos de Elisa.

7. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el proceso de investigación para la determinación de la actividad antimicrobiana de diez aceites esenciales frente *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y los cuatro compuestos de referencia (ampicilina, vancomicina, fluconazol e itraconazol).

7.1. OBTENCIÓN ACEITES ESENCIALES

De la obtención de los aceites esenciales realizada mediante hidrodestilación asistida por microondas, se obtuvieron los rendimientos experimentales que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de rendimientos en la obtención de aceite esenciales mediante el método de hidrodestilación asistida por microondas.

Material vegetal	Código herbario	% rendimiento de extracción experimental
Cáscaras de mandarina (<i>C. reticulata</i>)	N.A.	0,85
Semillas de anís (<i>P. anisum</i>)	N.A.	0,78
Cáscaras de naranja (<i>C. sinensis</i>)	N.A.	0,63
Hinojo (<i>F. vulgare</i>)	16194	0,59
Limonaria (<i>C. citratus</i>)	16190	0,45
Salvia (<i>S. officinalis</i>)	16191	0,31
Menta (<i>H. suaveolens</i>)	16195	0,30
Ruda (<i>R. graveolens</i>)	16192	0,28
Cidrón (<i>A. citriodora</i>)	16189	0,22
Geranio (<i>P. odoratissimum</i>)	16193	0,08

Fuente: Autores

Los rendimientos obtenidos fueron comparados con los registrados en literatura con métodos similares y se encontró que fueron buenos, presentando una variación considerable en el hinojo puesto que los estudios revisados trabajaron con el bulbo y no la parte aérea como se hizo en este trabajo.

7.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Se obtuvieron las corrientes iónicas totales reconstruidas de los aceites esenciales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y se obtuvo que los principales componentes mayoritarios presentes en las muestras de acuerdo con los porcentajes de áreas relativas son: limoneno 89,4% (*C. sinensis*), *trans* anetol 70,3%- 85,7% (*F. vulgare* y *P. anisum*), ledol 53% (*S. officinalis*), geranial 39,8% (*C. citratus*), 2-nonanona 35,3% y 2-undecadona 34,8% presentes en *R. graveolens* y citronelol 24,7% (*P. odoratissimum*). Un resumen de los componentes identificados en los aceites estudiados se presentan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales bajo estudio.

Compuesto	Tiempo de retención (min.)	% área relativa	Aceite esencial
Limoneno	21,10	89,40	<i>C. sinensis</i>
Trans anetol	38,13	70,39	<i>F. vulgare</i> ,
Trans anetol	38,14	85,70	<i>P. anisum</i>
Ledol	58,63	53,00	<i>S. officinalis</i>
Geranial	36,97	39,80	<i>C. citratus</i>
2-nonanona	24,88	35,30	<i>R. graveolens</i>
2-undecanona	31,13	34,80	<i>R. graveolens</i>
Neral	34,93	30,90	<i>C. citratus</i>
Citronelol	34,79	24,70	<i>P. odoratissimum</i>
τ-Cadinol	61,16	19,90	<i>S. officinalis</i>
Formiato de citronelilo	37,94	12,50	<i>P. odoratissimum</i>

Fuente: Autores

Los respectivos perfiles cromatográficos de los aceites esenciales estudiados se presentan en el Anexo A.

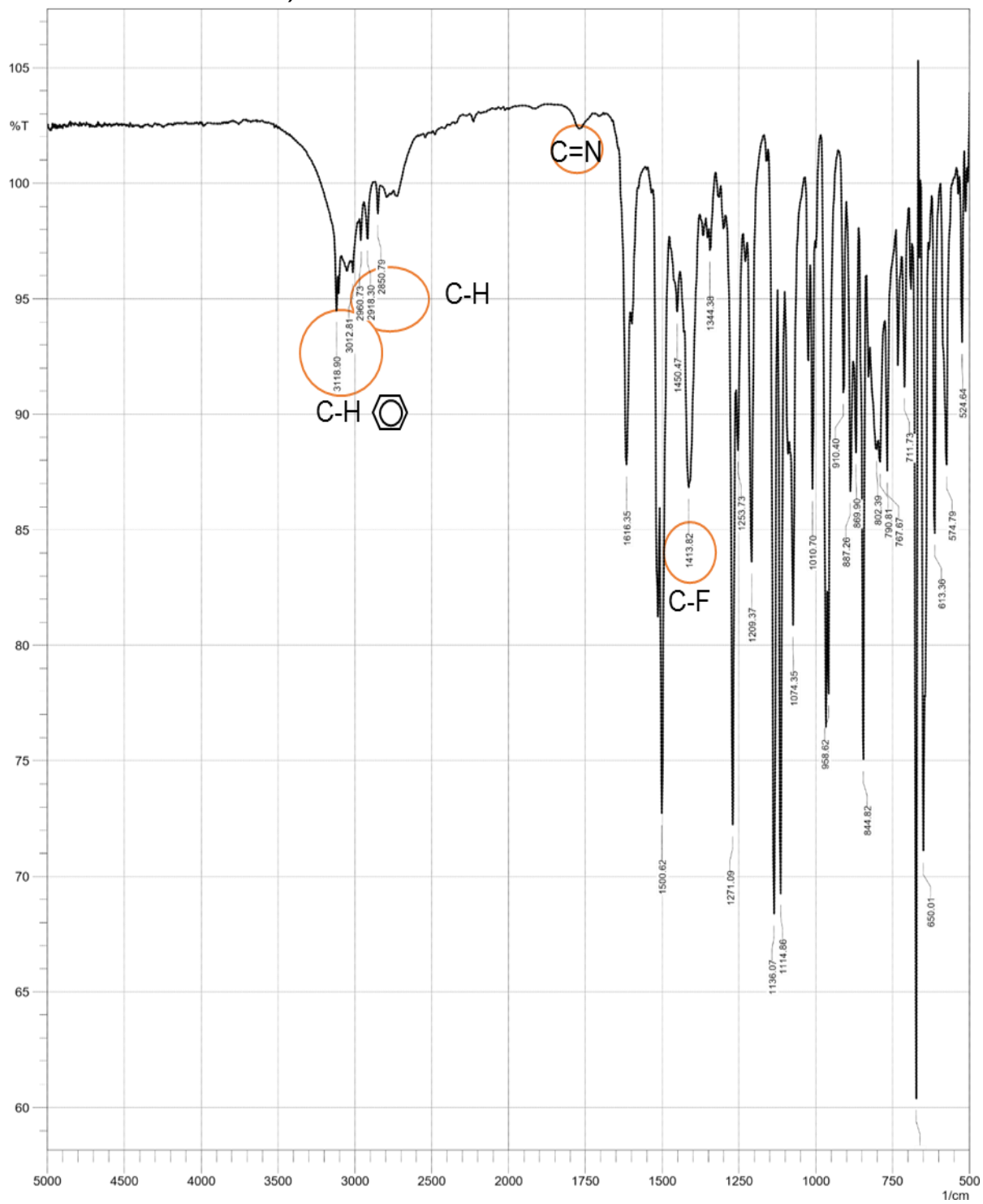
7.3. COMPUESTOS DE REFERENCIA EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se purificaron los compuestos de referencia itraconazol y fluconazol, empleados para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente a *S. aureus*, *C. albicans* y *E. faecalis*. La vancomicina y ampicilina no fueron purificados como se menciona en la metodología (Compuestos de referencia).

El rendimiento en el proceso de purificación para el fluconazol fue del 74%, en tanto que para el itraconazol fue del 70% debido a las pérdidas que se dan al recuperar los compuestos del balón. Para establecer el grado de pureza de los compuestos se obtuvieron los espectros infrarrojos los cuales se presentan en las Figura 10 y Figura 11.

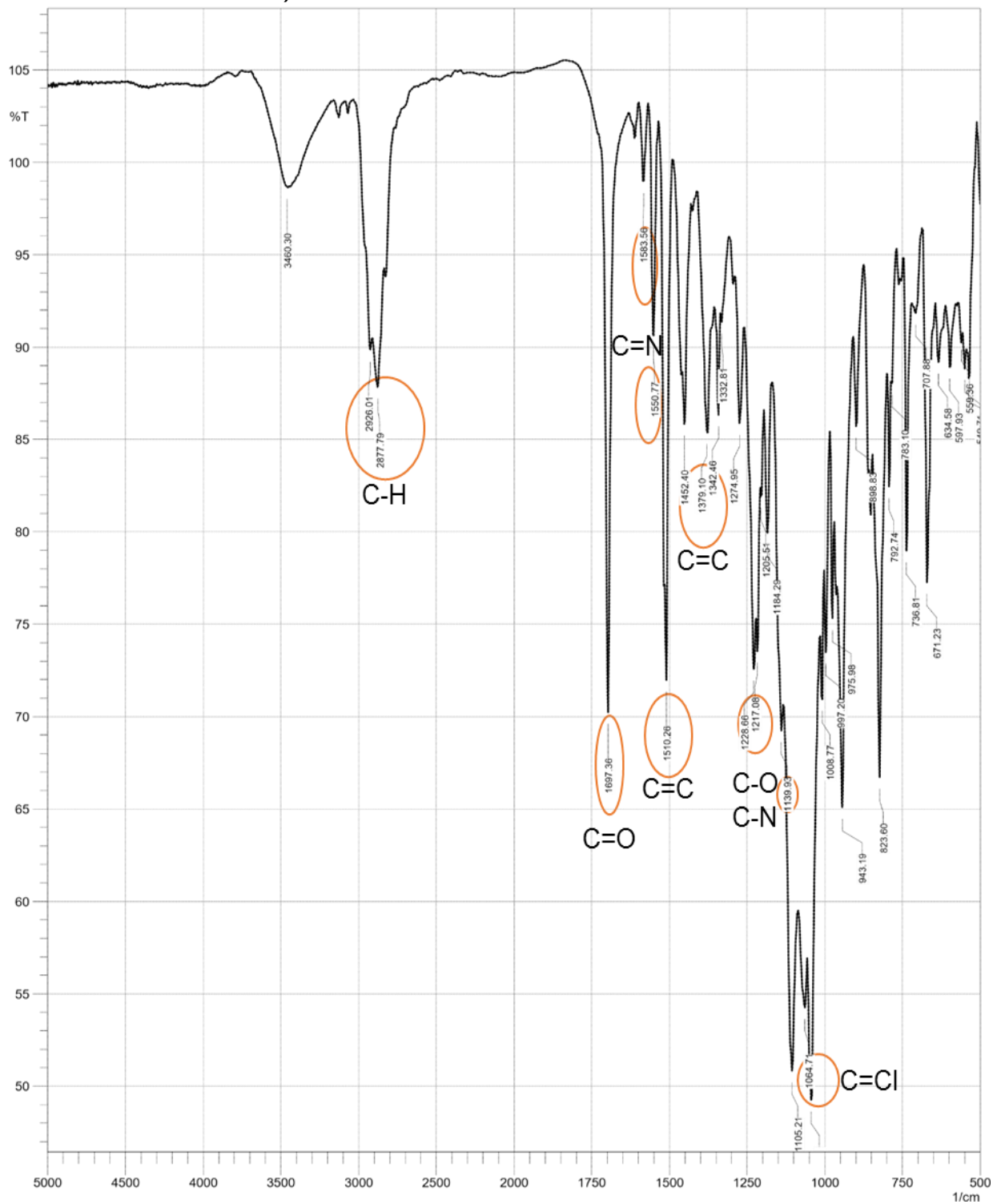
Los resultados de IR presentan similitud respecto a lo reportado en literatura; así, el análisis del espectro del fluconazol en la Figura 10 reporta la tensión de los enlaces aromáticos C-H que se encuentran entre los 3000 y 3100 cm^{-1} ; se observa la banda de tensión C=N entre los 1660 cm^{-1} como también la tensión C-F a 1413 cm^{-1} y la C-H alifática cercana a los 2900 cm^{-1} , valores comparables con los presentados en la patente del medicamento⁸⁰.

Figura 10 Espectro IR de fluconazol (IR Shimadzu, modelo IRA Affinity-1 con transformada de Fourier)



Fuente:Autores.

Figura 11 Espectro IR de itraconazol (IR Shimadzu, modelo IRA Affinity-1 con transformada de Fourier)



Fuente: Autores.

En cuanto al análisis del espectro químico del itraconazol se presenta en la Figura 11 la tensión de los enlaces C=C aromáticos entre 1510 y 1379 cm^{-1} y C-Cl a 1064 cm^{-1} ; los C-H alifáticos entre los 2800 y 2960 cm^{-1} , C=O a 1697 cm^{-1} , C=N entre 1550 y 1580 cm^{-1} ; y finalmente, la banda de los enlaces C-O y C-N entre los 1228, 1184 y 1139 cm^{-1} . Estos valores fueron comparados con los registrados por Abdulalah Al-Bard y Hussein El Subbagh⁷⁸.

6.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES.

La determinación de la CMI se realizó promediando los resultados de los triplicados de las placas de Elisa como se presenta en la Ecuación 2.

Ecuación 2. Para el cálculo de promedios

$$\bar{x} = \frac{CMI_1 + CMI_2 + CMI_3}{3}$$

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la MIC y la CBM de cada uno de los aceites frente *S. aureus* y *E. faecalis*, y de MIC y CFM para *C. albicans*, los resultados se presentan en $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Posible antimicrobiano	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	MIC (µg/ml)	CBM (µg/ml)	MIC (µg/ml)	CBM (µg/ml)	MIC (µg/ml)	CFM (µg/ml)
<i>Pelargonium odoratissimum</i>	>12002,0	>12002,0	>12002,0	>12002,0	>12002,0	>12002,0
<i>Aloysia citriodora</i>	7500,0	7500,0	>10000,0	>10000,0	>15625,0	>15625,0
<i>Hyptis suaveolens</i>	>12016,0	>12016,0	>12016,0	>12016,0	>12016,0	>12016,0
<i>Ruta graveolens</i>	>12058,0	>12058,0	>12058,0	>12058,0	>12058,0	>12058,0
<i>Cymbopogon citratus</i>	11671,0	15006,0	>20008,0	>20008,0	15006,0	10004,0
<i>Foeniculum vulgare</i>	>20000,0	>20000,0	>20000,0	>20000,0	>20000,0	>20000,0
<i>Salvia officinalis</i>	>20018,0	>20018,0	>20018,0	>20018,0	>20018,0	>20018,0
<i>Pimpinella anisum</i>	>20010,0	>20010,0	>20010,0	>20010,0	>20010,0	>20010,0
<i>Citrus reticulata</i>	>20080,0	>20080,0	>20080,0	>20080,0	>20080,0	>20080,0
<i>Citrus sinensis</i>	>20010,0	>20010,0	>20010,0	>20010,0	15007,0	12506,0
Vancomicina	13,5	26,7	8	16	NA	NA
Ampicilina	0,3	0,5	0,5	>64	NA	NA
Fluconazol	NA	NA	NA	NA	>16	>16
Itraconazol	NA	NA	NA	NA	>64	>64

*NA: No Aplica, es decir, que no se realizaron pruebas de ese compuesto frente a esas bacterias o levadura.

Fuente: Autores.

Los resultados que presentan el signo de mayor que (>) se deben a que los valores correspondientes a la CMI, CBM y CFM son concentraciones que superan las estudiadas en este trabajo.

En la Tabla 5 y Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para la determinación de la concentración inhibitoria del 50% de las colonias bacterianas (CI₅₀) y del 90% (CI₉₀), para cada uno de los aceites y compuestos de referencia estudiados.

Tabla 5. CI₅₀ y CI₉₀ presentada por los aceites esenciales (µg/ml)

Microorganismo/ Aceite esencial	CI	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
		Promedio	Desv. Estan.	Promedio	Desv. Estan.	Promedio	Desv. Estan.
<i>Pelargonium odoratissimum</i>	CI ₅₀	11,845	0,154	12,000	0	7,903	3,581
	CI ₉₀	12,000	0	12,000	0	10,562	1,439
<i>Aloysa citriodora</i>	CI ₅₀	8,088	1,510	4,067	1,181	11,732	3,892
	CI ₉₀	10,000	0	6,845	2,231	15,625	0
<i>Hyptis suaveolens</i>	CI ₅₀	9,921	2,094	12,016	0	12,012	0
	CI ₉₀	10,009	2,006	12,016	0	12,002	0
<i>Cymbopogon citratus</i>	CI ₅₀	11,531	2,588	3,918	2,600	10,359	3,481
	CI ₉₀	17,646	2,361	17,693	3,273	12,812	3,794
<i>Foeniculum vulgare</i>	CI ₅₀	16,217	3,782	20,000	0	15,977	4,022
	CI ₉₀	20,000	0	20,000	0	20,000	0
<i>Lepechinia schideana</i>	CI ₅₀	20,018	0	18,764	1,237	20,018	0
	CI ₉₀	20,018	0	20,018	0	20,018	0
<i>Pimpinella anisum</i>	CI ₅₀	14,994	3,989	20,01	0	18,545	9,145
	CI ₉₀	20,014	0,004	20,01	0	20,001	0
<i>Citrus reticulata</i>	CI ₅₀	19,650	0,367	20,008	0	20,08	0
	CI ₉₀	20,049	0,031	20,008	0	20,080	0
<i>Citrus sinensis</i>	CI ₅₀	20,014	0,004	13,355	0,008	8,957	4,751
	CI ₉₀	20,014	0,004	20,01	0	10,106	5,427
<i>Ruta graveolens</i>	CI ₅₀	7,109	4,948	12,058	0	6,328	5,677
	CI ₉₀	7,063	4,994	12,058	0	6,371	5,634

Tabla 6. CI₅₀ y CI₉₀ presentada por los compuestos de referencia (µg/ml)

Microorganism o/Compuesto	CI	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
		Promedio	Desv. Estan.	Promedio	Desv. Estan.	Promedio	Desv. Estan.
Vancomicina	CI ₅₀	6,747	3,756	7,976	6,021	NA	NA
	CI ₉₀	7,104	3,325	20,830	12,848	NA	NA
Ampicilina	CI ₅₀	0,278	0,027	0,059	0,025	NA	NA
	CI ₉₀	1,243	1,025	0,116	0,015	NA	NA
Itraconazol	CI ₅₀	NA	NA	NA	NA	0,655	0,207
	CI ₉₀	NA	NA	NA	NA	0,728	0,177
Fluconazol	CI ₅₀	NA	NA	NA	NA	6,003	6,002
	CI ₉₀	NA	NA	NA	NA	3,266	2,733

Fuente: Autores

En los resultados donde no aplica (NA) en la Tabla 7 se debe a que los compuestos de referencia no aplican para todos los microorganismos, siendo itraconazol y fluconazol exclusivos para las pruebas con *Candida albicans*. En ambas tablas se puede apreciar los valores aproximados de las concentraciones necesarias para inhibir el 50% y el 90% de las colonias para cada aceite y compuesto. La desviación estándar se calculó utilizando la ecuación que se muestra en la Ecuación 3.

Ecuación 3. Ecuación para el cálculo de la desviación estándar.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

En la Tabla 7 se presentan los resultados correspondientes a la MIC y CI₅₀ con cada uno de los microorganismos. Con estos datos se determinó la actividad de los aceites evaluados frente a cada patógeno de la siguiente manera: se consideró activo si se inhibió totalmente el crecimiento en las cajas Petri y en la lectura visual de las placas de Elisa; parcialmente activo si la MIC mostró inhibición, pero el XLfit presentó un CI₅₀ inferior al 50%, o viceversa; y se consideró inactivo cuando se presentó crecimiento en las cajas de Petri y los valores del CI₅₀ no presentaron inhibición. A continuación se pone “Si” cuando se presentó inhibición y “No” cuando hubo crecimiento.

Tabla 7. Determinación de la actividad antimicrobiana de cada AE

Aceite esencial	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀
<i>Pelargonium odoratissimum</i>	No	No	No	Si	No	Si
<i>Aloysia citriodora</i>	Si	Si	No	Si	No	Si
<i>Hyptis suaveolens</i>	No	No	No	Si	No	No
<i>Cymbopogon citratus</i>	Si	Si	No	Si	Si	Si
<i>Foeniculum vulgare</i>	No	No	No	Si	No	Si
<i>Salvia officinalis</i>	No	Si	No	No	No	No
<i>Pimpinella anisum</i>	No	No	No	Si	No	Si
<i>Citrus reticulata</i>	No	No	No	Si	No	No
<i>Citrus sinensis</i>	No	Si	No	No	Si	Si
<i>Ruta graveolens</i>	No	No	No	Si	No	Si

Fuente: Autores

7. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS

7.4. ACEITES ESENCIALES

La extracción de aceites esenciales se puede llevar a cabo por diferentes métodos. En este trabajo se usó la hidrodestilación asistida por microondas (EARMO) junto con material vegetal en estado fresco, en la Tabla 2 de resultados se presentaron los rendimientos experimentales de extracción de cada uno de estos aceites.

El rendimiento de la obtención de AEs se ve afectado por métodos de obtención, las condiciones geobóticas, el estado y cantidad de material vegetal empleado y la parte de la planta (hojas, tallo, raíz, florez, bulbo, fruto).

Los resultados obtenidos de los cromatogramas evidenciaron la presencia de componentes mayoritarios como el limoneno 89,4% (*C. sinensis*), trans anetol 70,3%- 85,7% (*F. vulgare* y *P. anisum*), ledol 53% (*S. officinalis*) y geranial 39,8% (*C. citratus*).

7.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales estudiados se realizaron pruebas de CMI y CBM como se describió en la metodología.

En la Tabla 4 se presentó como los AEs de *Aloysia citriodora* y *Cymbopogon citratus* mostraron actividad antimicrobiana frente *S. aureus*, presentando una CMI y CBM de 7500 µg/ml, y una CMI de 11671 µg/ml y CBM de 15006 µg/ml respectivamente; así como estos dos aceites presentaron actividad antimicrobiana frente a este microorganismo, el aceite esencial que resultó tener menor actividad fue *Citrus reticulata* con una MIC y CBM > 20080 µg/ml, seguido por los aceites de *Salvia officinalis*, *Pimpinella anisum*, *Citrus sinensis* y *Foeniculum vulgare*. En el caso de *E. faecalis* los aceites esenciales no presentaron actividad antimicrobiana.

El aceite esencial de *C. citratus* presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a *C. albicans* con una MIC de 15006 µg/ml y una CFM de 10004 µg/ml seguido del AE de *C. sinensis* con una MIC de 15007 µg/ml y CFM 12506 µg/ml; el aceite que presentó menor actividad fue el de *C. reticulata* con un valor >20080 µg/ml.

En el estudio se observó que de los diez AEs trabajados solo *C. citratus* presentó actividad frente *S. aureus* y *C. albicans*; pero ningún otro aceite presentó actividad relevante frente a más de uno de los microorganismos problema.

La vancomicina frente *S. aureus* presentó una MIC de 13,500 µg/ml y una CBM de 26,660 µg/ml, la ampicilina tuvo una MIC de 0,3437 µg/ml y CBM de 0,5000 µg/ml y con *E. faecalis* la MIC fue de 8,000 µg/ml y CBM 16,000 µg/ml con vancomicina y con ampicilina MIC de 0,5000 µg/ml y CBM >64,000 µg/ml. En la Tablas 5 y 6 se encuentran los de la CI₅₀ y la CI₉₀ para cada uno de los aceites y compuestos de referencia dando como resultando lo siguiente.

En el caso de *Staphylococcus aureus* el aceite que presentó una mejor CI₅₀ es el de *Cymbopogon citratus* con un valor de 3918,1 µg/ml, seguido por el aceite de *Aloysia citriodora* con una CI₅₀ de 4067,6 µg/ml, otros aceites que presentaron CI₅₀ fueron los de *Citrus sinensis* con 13355 µg/ml y *Salvia officinalis* con 18764 µg/ml.

En el caso de la CI₉₀ solo los aceites de *Cymbopogon citratus* y *Aloysia citriodora* la presentaron con 17693 µg/ml y 6845,0 µg/ml respectivamente, finalmente el aceite que resultó menos activo frente a este microorganismo fue el de *Citrus reticulata* cuya concentración estudiada fue de 20080 µg/ml y no presentó CI₅₀ ni CI₉₀.

Con *Enterococcus faecalis* ocho de los diez aceites presentaron CI₅₀, sin embargo los cuatro que presentaron una mayor actividad fueron *Ruta graveolens*, *Aloysia citriodora*, *Hyptis suaveolens* y *Cymbopogon citratus* con valores de 7109,0 µg/ml, 8088,1 µg/ml, 9921,7 µg/ml y 11531 µg/ml respectivamente, los que mostraron CI₉₀ fueron *Hyptis suaveolens* y *Cymbopogon citratus*; los aceites que exhibieron menor actividad fueron *Salvia officinalis* y *Citrus sinensis*.

Finalmente con *Candida albicans* los aceites que presentaron una mayor actividad con respecto al CI_{50} fueron *Ruta graveolens* con 6328,2 $\mu\text{g/ml}$, *Pelargonium odoratissimum* 7903,0 $\mu\text{g/ml}$, *Citrus sinensis* 8957,3 $\mu\text{g/ml}$ y 10359 $\mu\text{g/ml}$ con *Cymbopogon citratus*, aquellos que presentaron una menor actividad fueron los aceites de *Hyptis suaveolens*, *Salvia officinalis* y *Citrus reticulata*. En el caso de la CI_{90} los aceites que la presentaron fueron los de *Pelargonium odoratissimum*, *Cymbopogon citratus* y *Citrus sinensis*.

Haciendo una comparación de las CI_{50} de los aceites con respecto a los compuestos de referencia se tiene que las concentraciones de aquellos aceites que presentaron esta inhibición del 50% de las colonias son superiores a la de los compuestos de referencia que presentan CI_{50} de 7,9768 $\mu\text{g/ml}$ y 0,0591 $\mu\text{g/ml}$ con vancomicina y ampicilina respectivamente con *S. aureus*, con *E. faecalis* la vancomicina presento una CI_{50} de 6,7472 $\mu\text{g/ml}$ y la ampicilina de 0,2784 $\mu\text{g/ml}$, en el caso de la *C. albicans* los C_{50} de los compuestos de referencia fueron 0,6550 $\mu\text{g/ml}$ con itraconazol y 6,0031 $\mu\text{g/ml}$ con fluconazol; como se observa estos valores son menores que los presentados por los aceites. Lo mismo se evidencia con CI_{90} en los tres microorganismos.

Los aceites que presentaron CI_{50} con los tres microorganismos fueron *Aloysia citriodora* y *Cymbopogon citratus*; con *E. faecalis* y *C. albicans* fueron *P. odoratissimum*, *Foeniculum vulgare* y *Pimpinella anisum*; y con *S. aureus* y *C. albicans* fue *C. sinensis*, en el caso de CI_{90} el único aceite que presenta actividad con los tres microorganismos fue el de *Cymbopogon citratus*.

Teniendo en cuenta los datos reportados en la Tabla 7 se determinó la actividad de cada uno de los aceites, obteniendo que frente *S. aureus* los aceites de *Aloysia citriodora* y *Cymbopogon citratus* son activos, los aceites de *Salvia officinalis* y *Citrus sinensis* son parcialmente activos y los seis aceites restantes no son activos. Con *E. faecalis* los aceites de *Pelargonium odoratissimum*, *Aloysia citriodora*, *Hyptis suaveolens*, *Cymbopogon citratus*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum*, *Citrus reticulata* y *Ruta graveolens* son parcialmente activos, mientras que *Salvia officinalis* y *Citrus sinensis* no son activos.

Finalmente con *C. albicans* los aceites que fueron activos son: *Cymbopogon citratus* y *Citrus sinensis*, los aceites parcialmente activos fueron los de *Pelargonium odoratissimum*, *Aloysia citriodora*, *Foeniculum vulgare*, *Pimpinella anisum* y *Ruta graveolens*, y aquellos que no son activos fueron *Hyptis suaveolens*, *Salvia officinalis* y *Citrus reticulata*.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se siguieron los parámetros establecidos por la resolución 8430 de 1993, según el título IV, capítulo I de la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos.

Se recibió la capacitación necesaria para el desarrollo de este trabajo; se basó en protocolos de microbiología y normas de bioseguridad para evitar la contaminación cruzada; se realizaron estudios cuidadosos de los microorganismos, determinando el grupo de riesgo al que pertenecen y las medidas de contingencia para trabajarlos.

Adicionalmente, se contó con el apoyo de personal especializado en el área de microbiología, que se encargó de supervisar todo el proceso y verificar los medios de disposición final.

9. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los AEs en estado fresco mediante el método de hidrodestilación asistida por microondas. Las plantas con mayor rendimiento fueron *C. reticulata*, *P. anisum* y *C. sinensis*.
- Los componentes mayoritarios identificados en los aceites que presentaron actividad antimicrobiana de acuerdo con el porcentaje de área relativa, fueron: limoneno 89,4% (*C. sinensis*), geranial 39,8% y neral 30,90% (*C. citratus*) y *A. citriodora* con geranial(21,83%), neral (17,45%) y limoneno (11,3%).
- Los AEs de *A. citriodora* y *C. citratus* mostraron actividad antimicrobiana frente *S. aureus*; mientras que *C. citratus* y *C. sinensis* presentaron actividad frente a *C. albicans* y para el microorganismo *E. faecalis* los aceites no presentaron inhibición.
- Realizando una comparación entre los aceites esenciales que presentaron actividad antimicrobiana se determinó el orden de efectividad de estos según su concentración como *A. citriodora* > *C. citratus* > *C. sinensis*.
- La actividad antimicrobiana se ha relacionado con la estructura de los componentes de los aceites esenciales, así, en el trabajo se pudo observar que los AEs que contienen neral, geranial y limoneno (aquellos con reporte antimicrobiano) fueron los que presentaron inhibición.
- El método de microdilución en placa presenta ventajas a nivel técnico al no emplear una alta cantidad de reactivos y muestras, y la disminución de la manipulación y tiempo de análisis comparada con el método de macrodilución.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez, A. Aceites esenciales. *Univ. Antioquia* **2001**.
2. Saucedo, E. N. R. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* **2011**, 7, 153-170.
3. Murray, R.; Rosenthal, K.; Pfaller, M. Principios básicos de la microbiología médica. In *Microbiología médica*; GEA consultoria editorial, Ed.; Elsevier: España, 2006; Vol. 5, pp 7-46.
4. Nguyen, M. H.; Eells, S. J.; Tan, J.; Sheth, C. T.; Omari, B.; Flores, M.; Wang, J.; Miller, L. G. Prospective, Open-Label Investigation of the Pharmacokinetics of Daptomycin during Cardiopulmonary Bypass Surgery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, 55, 2499-2505.
5. Agudo, S.; Alarcón, T.; López-Brea, M.; Cibrelus, L.; Tellería, P. U.; Martínez, M. High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinicals isolates obtained from Spanish children. *Rev. Española de Quimioterapia* **2009**, 22, 88-92.
6. Eynard, A.; Valentich, M.; Rovasio, R. *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*; Panamericana: Argentina, 2008; Vol. 4, pp 339.
7. Bonet, R.; Garrote, A. Estomatitis aftosa recidivante. *Ambito farmacéutico* **2011**, 30, 40-46.
8. Lago Méndez, L.; Blanco Carrión, A.; Diniz Freitas, M.; Gándara Vila, P.; García García, A.; Gándara Rey, J. M. Glositis romboidal: localización atípica: Caso clínico y diagnóstico diferencial. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Ed.impresa)* **2005**, 10, 123-127.
9. Espinosa, C. J.; Cortés, J. A.; Castillo, J. S.; Leal, A. L. Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en cocos Gram positivos intrahospitalarios en Colombia. *Biomédica* **2011**, 31, 27-34.
10. Denning, D. W.; Hope, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol.* **2010**, 18, 195-204.
11. Valgas, C.; Machado de Souza, S.; Smânia, E.; Smânia Jr, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol. [online]* **2007**, 38, 369-380.

12. Shaabanm H.; El-Ghorab, A.; Takayuki, S. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Essent. Oil Res.* **2012**, *24*, 203-212.
13. Seow, Y. X.; Yeo, C. R.; Chung, H. L.; Yuk, H. G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 625-644.
14. Burt, S. A.; Reinders, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* **2003**, *36*, 162-167.
15. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223-253.
16. Friedman, M.; Henika, P. R.; Mandrell, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1545-1560.
17. Carson, C. F.; Hammer, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents* **2011**, 203-238.
18. Bersan, S.; Galvão, L.; Goes, V.; Sartoratto, A.; Figueira, G.; Rehder, V.; Alencar, S.; Duarte, R.; Rosalen, P.; Duarte, M. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2014**, *14*, 451-463.
19. Pappas, P. G.; Kauffman, C. A.; Andes, D.; Benjamin, D. K., Jr; Calandra, T. F.; Edwards, J. E., Jr; Filler, S. G.; Fisher, J. F.; Kullberg, B. J.; Ostrosky-Zeichner, L.; Reboli, A. C.; Rex, J. H.; Walsh, T. J.; Sobel, J. D.; Infectious Diseases Society of America Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 503-535.
20. Biasoli, M. Candidiasis. *Ceremic* **2013**, 31.
21. Gregorí Valdés, B. S. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia* **2005**, *39*, 1-1.
22. Forbes, B.; Sahm, D.; Weissfeld, A. Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana. In *Diagnóstico Microbiológico*; Rondinone, S., Ed.; Editorial Medica Panamericana: Argentina, 2009; Vol. 12, pp 181.
23. Wolff R., M. Consecuencias adversas inesperadas durante el uso de antimicrobianos: Cuándo el tratamiento puede ser peligroso para la salud. *Revista chilena de infectología* **2002**, *19*, S56-S61.

24. Nasir, B.; Fatima, H.; Ahmed, M.; Haq, I. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J Microbiol* **2015**, *1*, 1-12.
25. Davies, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **1994**, *264*, 375-382.
26. Akthar, M. S.; Degaga, B.; Azam, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research* **2014**, *2*, 1-7.
27. Murbach Teles Andrade, Bruna Fernanda; Nunes Barbosa, L.; da Silva Probst, I.; Fernandes Júnior, A. Antimicrobial activity of essential oils. *J. Essent. Oil Res.* **2014**, *26*, 34-40.
28. Reller, L. B.; Weinstein, M.; Jorgensen, J. H.; Ferraro, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* **2009**, *49*, 1749-1755.
29. Tenover, F. C.; Swenson, J. M.; O'Hara, C. M.; Stocker, S. A. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 1524-1527.
30. Street, T. Antimicrobial susceptibility. *Medscape* **2014**, 1-3.
31. Levinson, W. Capítulo 11. In *Antimicrobial Drugs: Resistance*; Review of Medical Microbiology and Immunology., Ed.; McGraw-Hill: New York, 2010; Vol. 11, .
32. Boundless Microbiology Minimal inhibitory concentration (MIC). <https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/antimicrobial-drugs-13/measuring-drug-susceptibility-157/minimal-inhibitory-concentration-mic-790-10813/> (accessed 06/19, 2015).
33. Gyawalia, R.; Ibrahim, S. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* **2014**, *46*, 412-429.
34. Cowan, M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 564-582.
35. Acosta, M.; González, M.; Araque, M.; Velazco, E.; Khouri, N.; Rojas, L.; Usubillaga, A. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilium* L. var *basilium*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissium* L., y

- O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosomial. *Rev Fac Farm* **2003**, 45, 19-24.
36. Wang, B. Q. *Salvia miltiorrhiza* chemical and pharmacological review of a medicinal plant. *J. Med. Plant Res.* **2010**, 4, 2813-2820.
 37. Coy Barrera, C. A.; Cuca Suárez, L. E.; Quintero Londoño, C. Farmacognosia y farmacobotánica de especies pertenecientes a los géneros *Esenbeckia* y *Raputia* (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* **2013**, 18, 638-653.
 38. Celis, C. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*, UIS, Colombia, 2007.
 39. Blazier, J. C.; Guisinger, M. M.; Jansen, R. K. Recent loss of plastid-encoded *ndh* genes within *Erodium* (Geraniaceae). *Plant Mol. Biol.* **2011**, 76, 263-272.
 40. Giraldo-Cañas, D. Catálogo de la familia Poaceae en Colombia. *Darwiniana, nueva serie* **2011**, 49, 139-247.
 41. Hodkinson, T.; Savolainen, V.; Jacobs, S.; Bouchenak-Khelladi, Y.; Kinney, S.; Salamin, N. Supersizing: Progress in documenting and understanding grass species richness. In *Reconstructing the Tree of Life: Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa*; Hodkinson, T., Parnell, J., Eds.; Systematics Association: Boca Ratón, 2007; Vol. 72, pp 275-295.
 42. Menglan, S.; Fading, P.; Zehui, P.; . Watson, F.; Cannon, J.; Holmes, I.; Kljuykov, E.; Phillippe, R.; Pimenov, M. Apiaceae (Umbelliferae). *Flora of China* **2005**, 14, 1-205.
 43. Vargas Flores, T.; Villazante Condori, L. G. Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga* **2014**, 44, 2309-2313.
 44. Lowy, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 339, 520-532.
 45. Gennaro, A. Drogas sistémicas para el tratamiento de infecciones mucocutáneas. In *Remington Farmacia Panamericana*: Argentina, 2003; Vol. 2, pp 1855-1868.
 46. Gomes, B. P. F. A.; Ferraz, C. C. R.; M. E., V.; Berber, V. B.; Teixeira, F. B.; Souza-Filho, F. J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of

sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int. Endod. J.* **2001**, 34, 424-428.

47. Gilmore, M. S.; Lebreton, F.; van Schaik, W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, 16, 10-16.
48. Patanè, S. Is there a need for bacterial endocarditis prophylaxis in patients undergoing urological procedures? *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2014**, 7, 369-371.
49. Instituto de salud pública de Chile Vigilancia de *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina. Chile, 2010- 2012. *ISP* **2013**, 3, 1-21.
50. Nigroni, M.; Piovano, S. Microbiología de las enfermedades gingivoperiodontales, de la periimplantitis, de los conductos radiculares y de los procesos perirradiculares. In *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*; Alvarez, M., Ed.; Panamericana: Argentina, 2009; Vol. 2, pp 320-322.
51. Cercenado, E. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **2011**, 29, Supplement 5, 59-65.
52. Acosta, S. *Enterococcus*. *COINEP* **2005**, 1, 1-16.
53. Zamora, R.; Areu, A.; Gundián, J.; Manresa, R.; Sánchez, J.; Morales, R. In *In Cefalosporinas*; Cefalosporinas; Hospital clínico quirúrgico Hermanos Ameijeiras: Cuba, 1998; Vol. 8, pp 40-48.
54. Eriksen, N. L.; Blanco, J. D. Extended-spectrum (second- and third-generation) cephalosporins. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **1992**, 19, 461-474.
55. Gennaró, A. Drogas antiinfecciones. In *Remington Farmacia* Panamericana: Argentina, **2003**; Vol. 2, pp 1815-1820.
56. Marín, M.; Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2003**, 21, 116-129.
57. Liébana, J. Microbiología oral. In McGrawHill: España, 2002; Vol. 2, .
58. Nolte, W. *Oral Microbiology with basic microbiology and inmunology*; Darlene Warfel: EEUU, **1982**; Vol. 4.

59. Alvarez, M.; Solano, A. Prevalencia de *Candida albicans* en individuos portadores de prótesis total, que asisten a la clínica odontológica de la USTA y a instituciones geriátricas de Floridablanca, USTA, Bucaramanga, 2004.
60. Fica, A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Revista chilena de infectología* **2004**, *21*, 26-38.
61. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum: fluconazol. <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Fluconazol.pdf> (accessed 04/01, 2015).
62. Piñeiro, G.; Olivera, R.; Guindel, C. Administración de medicamentos en pacientes con nutrición enteral mediante sonda. *Nutr. Hosp* **2006**, *21*, 207-63.
63. Essawi, T.; Srour, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *70*, 343-349.
64. Nantitanon, W.; Chowwanapoonpohn, S.; Okonogi, S. Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Sci. Pharm.* **2007**, *75*, 35-46.
65. Andrade, M. A.; Cardoso, M. G.; Batista, L. R.; Freire, J. M.; Nelson, D. L. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Pelargonium odoratissimum*. *Braz. J. Pharamacogn.* **2011**, *21*, 47-52.
66. Juárez, R.; Castro, A.; Jaúregui, J.; Lizano, J.; Carhuapoma, M.; Choquesillo, F.; Félix, L.; Cotillo, P.; López, J.; Jaramillo, M.; Córdova, A.; Ruíz, J.; Ramos, N. |Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L.(Naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e investigación* **2010**, *13*, 9-13.
67. Guerra, L.; Soto, L.; Medina, Z.; Ojeda de R, G.; Peña, Y. J. Antibacterial activity of the essential oil of orange barks (*Citrus sinensis*) var. Valencia against positive and negative gram microorganisms. *Rev. Facul. Agron.* **2014**, *31*, 215-232.
68. Shahzad, K.; Nawaz, S.; Ahmad, R.; Akram, N.; Iqbal, Z. Evaluation of antibacterial, antifungal and antioxidant activity of essential oil of *Citrus reticulata* fruit (tangerine fruit peel). *Pharmacologyonline* **2009**, *3*, 614-622.
69. Hasimi, N.; Tolan, V.; Kizil, S.; Kilingç, E. Determination of essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of anise (*Pimpinella*

anisum L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.) Seeds. *Tarim Bilimleri Dergisi* **2014**, 20, 19-26.

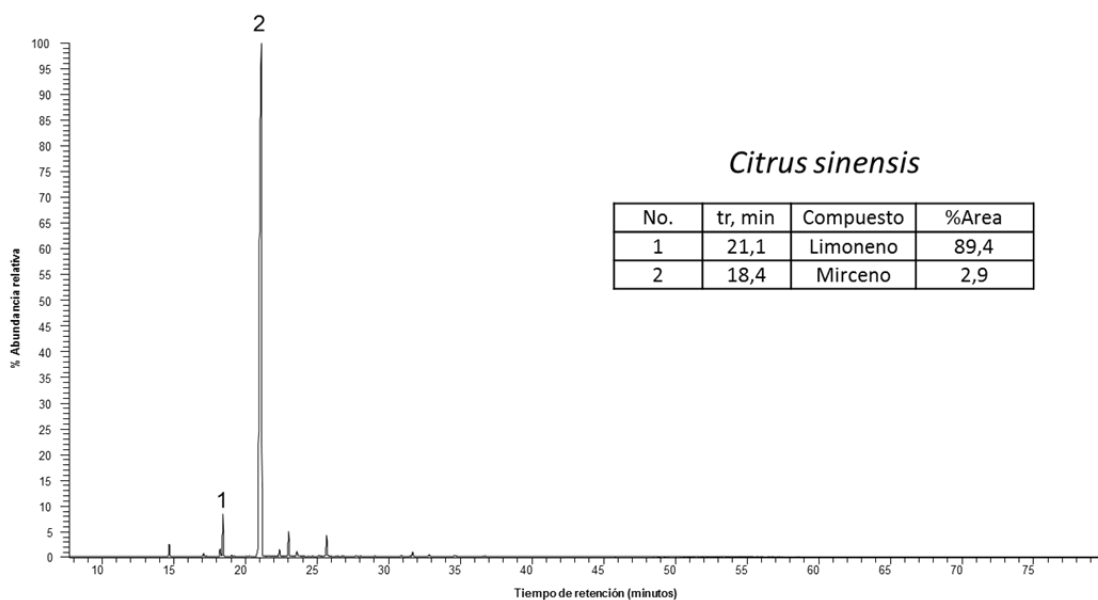
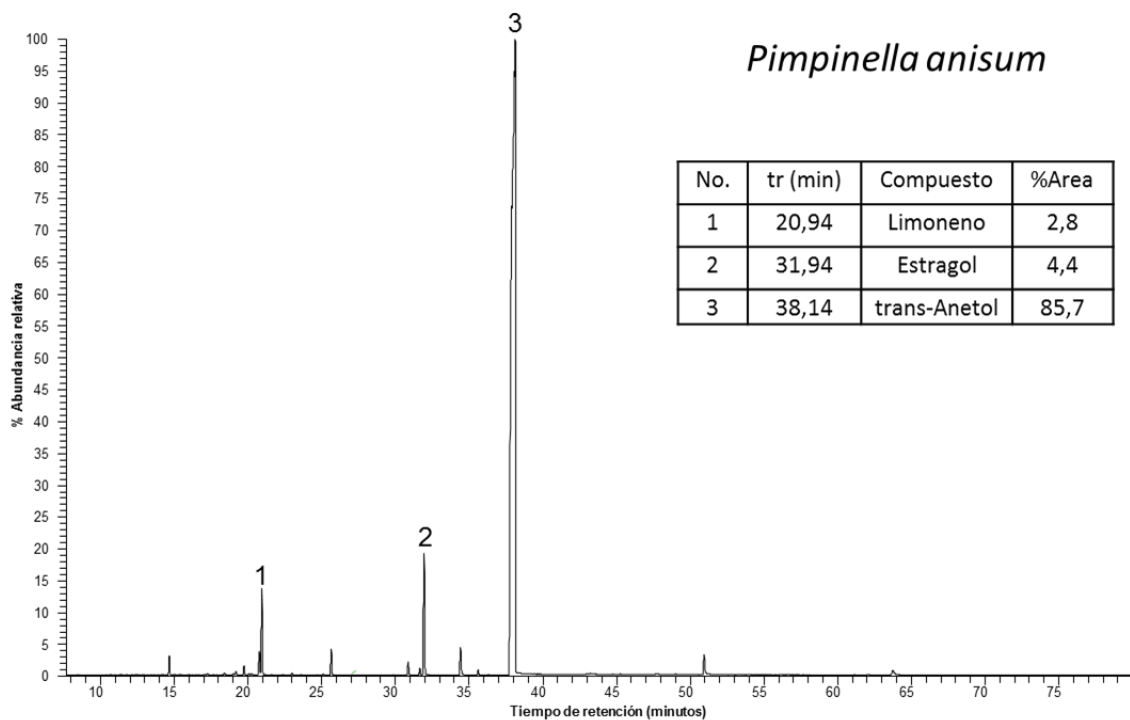
70. Bersan, S. M.; Galvao, L. C.; Goes, V. F.; Sartoratto, A.; Figueira, G. M.; Rehder, V. L.; Alencar, S. M.; Duarte, R. M.; Rosalen, P. L.; Duarte, M. C. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, 14, 451-6882-14-451.
71. Ahmad, A.; Viljoen, A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* **2015**, 22, 657-665.
72. Khalil, R.; Li, Z. -. Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, 10, 8397-8402.
73. Mota, A. S.; Rosário Martins, M.; Arantes, S.; Lopes, V. R.; Bettencourt, E.; Pombal, S.; Gomes, A. C.; Silva, L. A. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese *Foeniculum vulgare* fruits. *Nat. Pro. Comm.* **2015**, 10, 673-676.
74. Haddouchi, F.; Chaouche, T. M.; Zaouali, Y.; Ksouri, R.; Attou, A.; Benmansour, A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem.* **2013**, 141, 253-258.
75. Al-Deen, M. G. N.; Mansoor, R.; ALJoubbeh, M. Fluctuations of chemical composition of essential oil and antimicrobial of lemon verbena (*Lippia citriodora*) during growth stages in Syria. *Int. J. ChemTech Res.* **2015**, 8, 704-710.
76. Joulain, D.; König, W., Eds.; In *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*; Hamburg : E.B.-Verlag: Alemania, 1998; , pp 658.
77. Wallace, J. E.; Harris, S. C.; Gallegos, J.; Foulds, G.; Chen, T. J.; Rinaldi, M. G. Assay of fluconazole by high-performance liquid chromatography with a mixed-phase column. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 603-606.
78. Al-Bard, A.; El-Subbagh, H. Itraconazole, comprehensive profile. In *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*; Brittain, H., Ed.; ElSevier: Kingdom of Saudi Arabia, 2009; Vol. 34, pp 193-264.
79. Clinical and Laboratory Standards Institute *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.Aproved Standard. Third edition.* ; Clinical and Laboratory Standards Institute: USA, 2008; Vol. 22.

80. Palomo, A. España Patent 663, 1994.

ANEXOS

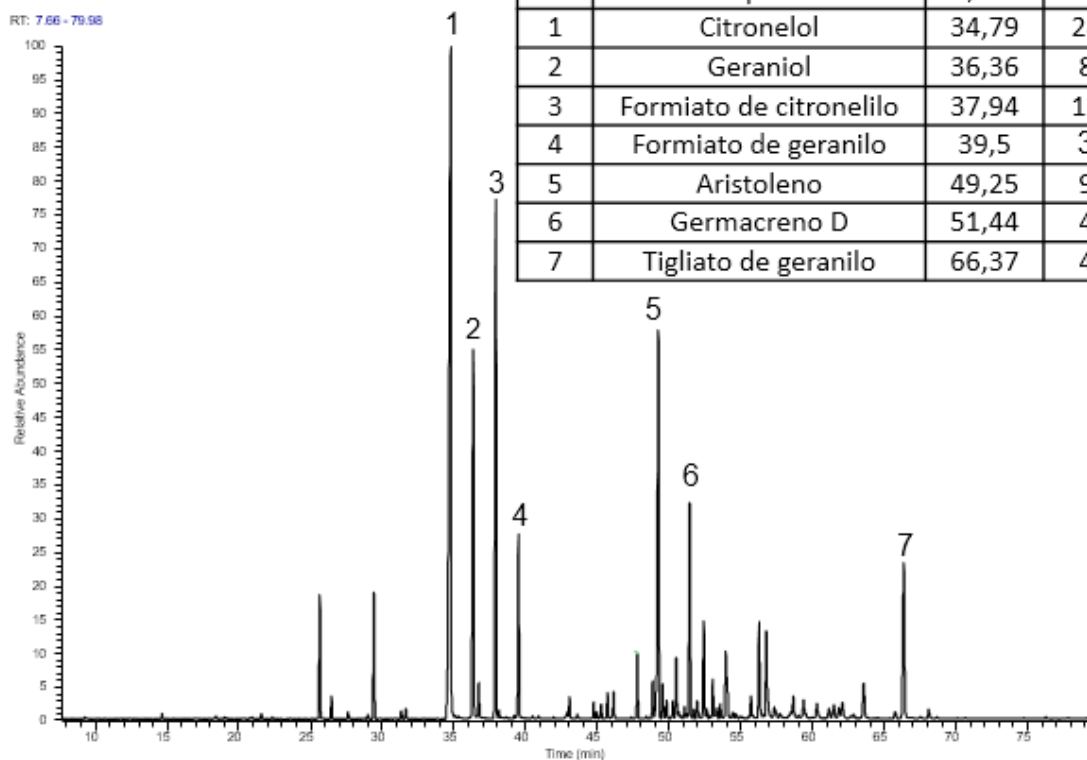
Anexo A Cromatogramas de aceites esenciales.

A continuación, se presentan los cromatogramas de los aceites esenciales estudiados y el porcentaje de área de sus compuestos mayoritarios.



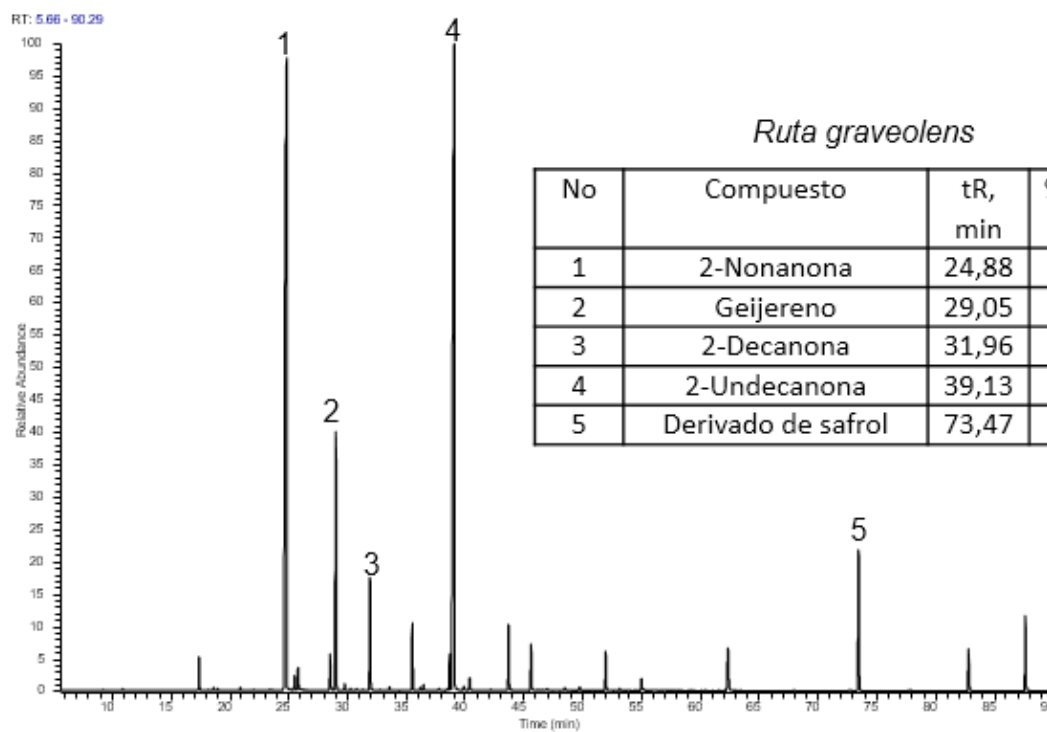
Pelargonium odoratissimum

RT: 7.66 - 79.98



No	Compuesto	tR, min	%Área
1	Citronelol	34,79	24,7
2	Geraniol	36,36	8,9
3	Formiato de citronelilo	37,94	12,5
4	Formiato de geranilo	39,5	3,7
5	Aristoleno	49,25	9,8
6	Germacreno D	51,44	4,8
7	Tigliato de geranilo	66,37	4,8

RT: 5.66 - 90.29



Ruta graveolens

No	Compuesto	tR, min	%Area
1	2-Nonanona	24,88	35,3
2	Geijereno	29,05	7,1
3	2-Decanona	31,96	2,9
4	2-Undecanona	39,13	34,8
5	Derivado de safrol	73,47	4,2

